UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD CENTRE D'ORSAY

N° d'ordre : 1519

THÈSE

présentée

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Josef MORAVEC, M. D.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MITOCHONDRIES CARDIAQUES

Soutenue le 30 Juillet 1975, devant la Commission d'examen

MM. les Professeurs	E. CORABŒUF . .	*Président*
	P. HARRIS	*Examinateurs*
	P.Y. HATT	
	O. POUPA	
	P. VIGNAIS	
	L.H. OPIE	*Examinateur externe*

LYON
Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544725_0004

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MITOCHONDRIES CARDIAQUES

UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD CENTRE D'ORSAY

N° d'ordre : 1519

THÈSE

présentée

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Josef MORAVEC, M. D.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MITOCHONDRIES CARDIAQUES

Soutenue le 30 Juillet 1975, devant la Commission d'examen

MM. les Professeurs	E. CORABŒUF . .	*Président*
	P. HARRIS	*Examinateurs*
	P. Y. HATT	
	O. POUPA	
	P. VIGNAIS	
	L. H. OPIE	*Examinateur externe*

LYON
Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42
—
1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon père,

A Monsieur le Docteur Pierre Yves HATT,

et aux professeurs qui m'ont tout appris :

Prof. T. BRAUN
Dr. R. BRDIČKA
Prof. J. CHARVÁT
Prof. E. CORABOEUF
Prof. P. HARRIS
Prof. L.H. OPIE
Prof. O. POUPA
Prof. P. VIGNAIS

Ce travail a été réalisé essentiellement dans l'Unité de Pathologie Cardiovasculaire de l'I.N.S.E.R.M. du Professeur P.Y. HATT.

Certaines expériences ont été faites au cours de stages à l'étranger chez les Professeurs B. CHANCE, D. LÜBBERS et A. PEARSE.

Une série d'expériences a été réalisée en collaboration étroite avec le Professeur L.H. OPIE.

Je tiens à les remercier.

P L A N

AVANT PROPOS

I. INTRODUCTION ..... p. 15

A. - ULTRASTRUCTURE DES MITOCHONDRIES

1. Généralités ..... p. 15
2. Particularités de l'ultrastructure des mitochondries cardiaques ..... p. 19
3. Aspects pathologiques ..... p. 20

B. - ROLES PHYSIOLOGIQUES DES MITOCHONDRIES

1. Production d'énergie ..... p. 23
2. Couplage excitation-contraction ..... p. 43
3. Contrôle du métabolisme intermédiaire .. p. 47

C. - CORRELATIONS ENTRE L'ULTRASTRUCTURE ET LA FONCTION DES MITOCHONDRIES

1. Activité mécanochimique des mitochondries p. 55

D. - REVUE DES TECHNIQUES ACTUELLES UTILISEES DANS L'ETUDE DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES

1. Technique d'étude des fonctions des mitochondries isolées ..... p. 60
2. Technique d'étude des fonctions des mitochondries in situ ..... p. 63

II. CONTRIBUTION PERSONNELLE ..... p. 72

A. - MATERIEL ET TECHNIQUES EMPLOYES :

1. Animaux ..... p. 72
2. Perfusion des coeurs isolés ..... p. 72
3. Contrôle des performances mécaniques.... p. 74
4. Contrôle de l'état métabolique au cours de la perfusion ..... p. 78
5. Analyses biochimiques ..... p. 85
6. Microscopie électronique ..... p. 86

B. - RESULTATS ET DISCUSSION :

B.I. Corrélation entre l'ultrastructure et la fonction des mitochondries cardiaques du coeur intact ..... p. 90

1. Analyse ultrastructurale des lésions cardiaques provoquées par l'isoprotérénol ..... p. 90
2. Analyse ultrastructurale des répercussions d'une hypoxie myocardique subaiguë ..... p. 113
3. Etude simultanée de l'état métabolique et de l'ultrastructure mitochondriale du coeur isolé perfusé.. p. 126

B.II. Etude de l'activité de la chaine respiratoire et du cycle de KREBS du coeur intact ..... p. 146

1. Etude de la respiration du coeur isolé par mesures de l'émission fluorescente des pyridine nucléotides..... p. 148

2. Etude de la respiration du coeur isolé par enregistrement des spectres d'absorption des cytochromes... p. 167
3. Etude biochimique de l'activité du cycle de KREBS du coeur isolé ..... p. 180

III. CONCLUSION ..... p. 187

IV. SUMMARY ..... p. 193

V. BIBLIOGRAPHIE ..... p. 201

AVANT PROPOS

L'importance du métabolisme intermédiaire pour le maintien des diverses fonctions cellulaires est bien établie. Sans un apport continu d'énergie, les structures cellulaires seraient bientôt usées et des troubles fonctionnels inévitables.

Le maintien des performances physiologiques exige un taux élevé d'ATP, source d'énergie pour la plupart des fonctions biologiques, et dont la formation est assurée par la dégradation oxydative des divers substrats. Les voies métaboliques les plus actives, impliquées dans la synthèse de l'ATP, sont localisées à l'intérieur des mitochondries.

Le métabolisme mitochondrial aérobie représente dans le cas du muscle cardiaque plus de 80 % de la capacité globale du métabolisme énergétique. Tout défaut de la production mitochondriale d'énergie pourrait donc avoir des répercussions immédiates sur la fonction du myocarde, dont le "turnover" énergétique est très élevé. Dans le cas le moins grave, il pourrait s'agir d'une diminution des réserves fonctionnelles nécessaires pour affronter les dépenses énergétiques accrues (effort), dans les cas plus sévères une défaillance cardiaque congestive ou une nécrose (infarctus), peuvent apparaître.

C'est pourquoi la recherche des techniques permettant d'étudier l'état fonctionnel des mitochondries cardiaques au cours de diverses conditions expérimentales, préoccupe actuellement de nombreux laboratoires, les techniques utilisées étant les plus diverses (microsco-

pie électronique, mitochondries isolées, dosages des métabolites du cycle de KREBS dans les extraits tissulaires, techniques optiques, traceurs isotopiques).

Le but de notre travail était double : examiner les relations éventuelles entre l'ultrastructure et l'état fonctionnel des mitochondries cardiaques in situ, et mettre au point un certain nombre de techniques optiques permettant d'étudier l'activité respiratoire des mitochondries des coeurs intacts. En choisissant ces sujets précis, nous avons voulu répondre à quelques-unes des questions qu'un ingénieur chimiste, L.E. SCRIVEN, pose aux biologistes :

> "Were a chemical engineer to capture a strange factory, the last thing he would think of would be use a steamroller and then separate the wreckage by sedimentation. Nor would he freeze the factory and saw it up for analysis. Therefore, he is impressed by the fruitfulness of the anologous strategems of the biologist. The engineer would probe to produce transients while the factory is functioning. Of the biologist he asks, are all available methods for manipulating intact cells being exploited ? Is adequate effort being devoted to developing new techniques to study reaction rates within single living cell ?"

En effet, nous pensons avec SCRIVEN (297), qu'une étude sur les organes vivants est seule capable d'apporter des éléments nouveaux à la compréhension des divers états pathologiques. Le choix des techniques, que nous avons utilisées dans notre travail, s'appuie sur cette conviction.

I. INTRODUCTION

A. - ULTRASTRUCTURE DES MITOCHONDRIES

1. Généralités

L'étude de l'ultrastructure des mitochondries, comme de tout autre organite cellulaire, n'était possible qu'après l'apparition des premiers ultramicrotomes. C'est à PALADE (240, 241) et SJØSTRAND (032, 303) que nous devons les premières descriptions de l'architecture mitochondriale, qui, désormais, restent valables.

La longueur d'une mitochondrie est environ de 3 µ, sa largeur entre 0,5 - 1,0 µ. La taille et l'aspect des mitochondries varient beaucoup en fonction de la technique de fixation (MUNN, 214 ; HATT, 101 ; FORSMANN, 79) et des colorants utilisés (REYNOLDS, 279 ; JUDAH, 25 ; FERNANDEZ-MORAN, 75). Il y a également des différences entre les mitochondries des divers organes (SLAUTTERBACK, 307 ; REYNOLDS, 279). Cependant on peut reconnaitre un certain nombre de traits communs :

Chaque mitochondrie est entourée par deux membranes concentriques - interne et externe (Fig. 1). La membrane interne forme de nombreuses invaginations (crêtes mitochondriales, PALADE, 240) dans l'espace interne des mitochondries. L'espace entre les crêtes est occupé par un matériel protéique et visqueux, la matrice mitochondriale, contenant à l'état normal plusieurs grains denses, corpus intracristam, dont le diamètre varie entre 200-250 Å et dont le nombre dépend l'état métabolique du tissu (HATT, 107 ; POCHE, 253).

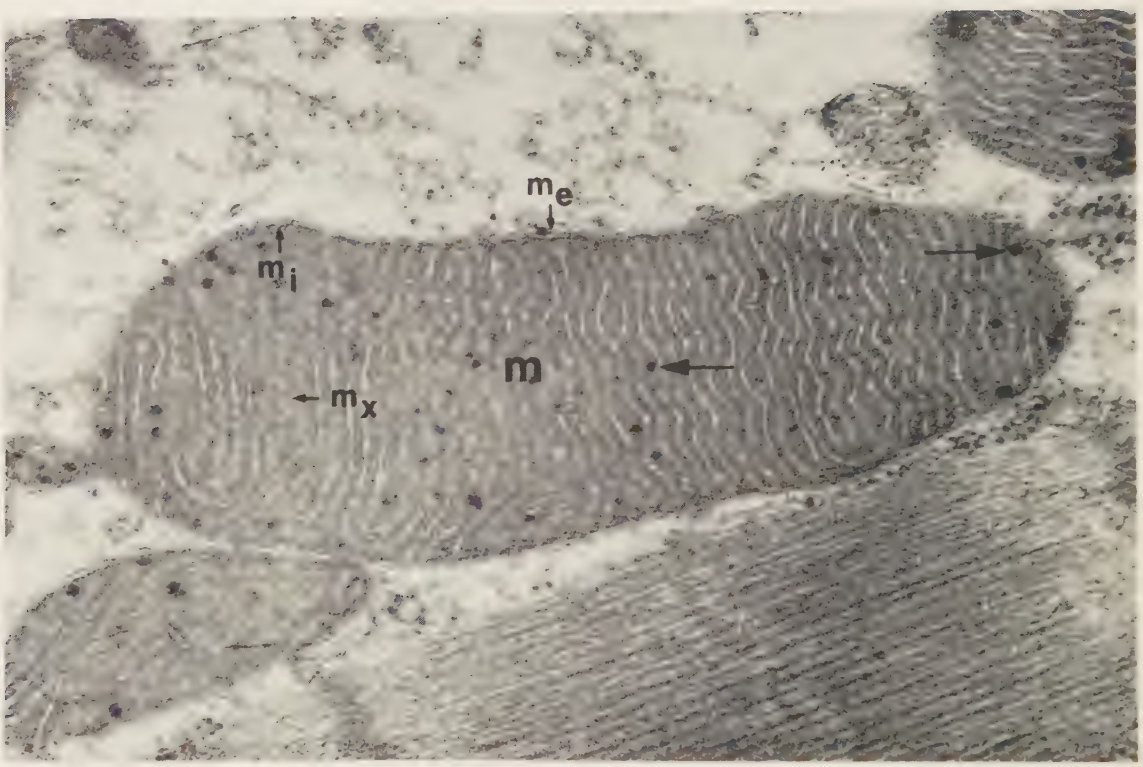


FIG. 1. ULTRASTRUCTURE D'UNE MITOCHONDRIE CARDIAQUE (m) : fixation in situ par le glutaraldéhyde, post-fixation par l'OsO_4 et coloration par le citrate de Pb ; me - membrane externe, mi - membrane interne, mx - matrice contenant de nombreux "corpus intracristam" (↙).

Les deux membranes sont composées de deux couches osmiophiles de 20 Å séparées par une couche protéique de 25 Å (sandwich-like structure). L'épaisseur totale de la membrane interne et celle de la membrane externe est environ 60 Å, celle de l'espace intermembranaire est de 80 Å.

Les crêtes sont légèrement plus épaisses (220-250 Å) qu'une simple reduplication de la membrane interne. Leur structure est également plus complexe que celle des autres membranes cellulaires. En effet, FERNANDEZ-MORAN (11, 75), CHANCE (40) et d'autres auteurs (PARSON, 244) ont pu démontrer un aspect particulier de la surface des crêtes. Sur les préparations colorées négativement par l'acide phosphotungstique (FERNANDEZ-MORAN, 75), la membrane interne est bordée de "polyplike particles". Le diamètre de chaque particule varie entre 70 et 100 Å, la longueur de son pied est égale à 40 Å environ (PARSON, 243). L'existence de telles structures protéiques implantées dans le support lipidique de la membrane a été également signalé par HACKENBROCK (96) qui a utilisé un procédé physique (freeze etching) pour fixer les mitochondries. En plus, HACKENBROCK a pu démontrer que la distribution de ces particules dans la membrane interne est extrêmement variable, elle dépend notamment de l'état énergétique de la membrane (96). Pour certains auteurs (GREEN, 83, 99 ; CHANCE, 40) les structures décrites par FERNANDEZ-MORAN (75) sont équipées de toutes les enzymes de la chaine respiratoire et de l'oxydation phosphorylante. La membrane interne ne serait qu'une mosaïque composée de tels éléments dont chacun doit être considéré comme une unité respiratoire autonome (oxysome).

La surface de la membrane interne va déterminer alors les réserves fonctionnelles de la mitochondrie

(LEHNINGER, 166) ; des chiffres extraordinaires sont donnés par LEHNINGER : la surface de la membrane interne est évaluée respectivement à 250 et 50 m^2 par g de protéines dans le cas des mitochondries cardiaques et hépatiques ; les activités respiratoires de ces dernières diffèrent à peu près dans les mêmes proportions (LEHNINGER, 166).

La complexité de la structure de la membrane interne est également suggérée par les travaux concernant sa perméabilité aux divers métabolites. Contrairement à la membrane externe, qui est librement perméable à la plupart des substrats et des ions (LEHNINGER, 166, 167 ; KLINGENBERG, 135) la membrane interne ne fait passer qu'un très petit nombre de substances de poids moléculaire faible (eau, phosphore inorganique, urée, glycérol et corps cétoniques). La pénétration des substrats du cycle de KREBS et de l'oxydation phosphorylante tel que malate, oxaloacétate, α kétoglutarate, ATP, ADP et des pyridine - nucléotides, est assurée par la présence de systèmes enzymatiques hautement spécifiques (VIGNAIS, 331 ; PFAFF, 251). Les transferts d'ions eux aussi se font dans la plupart des cas à l'aide de translocases sélectives (CHANCE, 34, 41 ; ROSSI, 284 ; CHAPPELL, 50 ; HARRIS, 98).

A côté de la structure hautement élaborée de la membrane interne, la matrice mitochondriale parait à première vue assez amorphe ; elle est cependant composée d'un gel protéique bien organisé contenant tout l'équipement enzymatique du cycle de KREBS, et de l'oxydation β (GREEN, 88). De nombreuses transaminases (LOWENSTEIN, 177, 178 ; KREBS, 153) sont également pré-

sentes dans l'espace interne des mitochondries. Elles jouent, parait-il, un rôle important dans la régulation du métabolisme intermédiaire et l'intégration des diverses voies métaboliques cellulaires (SAFER, 289 ; MEIJER, 187, 188 ; LOWENSTEIN, 177, 178).

2. Particularité de l'ultrastructure des mitochondries cardiaques.

Contrairement aux autres types de muscles, le coeur ne contracte pas facilement une dette en oxygène, car la production d'ATP se fait essentiellement en aérobiose (cf. HATT, 101 ; OPIE, 230). Sa consommation d'oxygène est cependant très élevée par rapport aux autres tissus 15 ml/100 g/min, (CHALLONER, 30 ; GREGG, 86) conséquence des dépenses énergétiques importantes.

Cette grande capacité respiratoire du myocarde doit s'appuyer sur un certain nombre de particularités ultrastructurales. Les études morphométriques (WEIBEL, 337 ; LOUD, 176) montrent en effet, une grande densité des capillaires, un par cellule (WACHTLOVA, 335 ; RAKUSAN, 268 ; POUPA, 257). La masse mitochondriale d'une cellule cardiaque représente environ 32 % du volume cellulaire (PAGE, 239 ; HATT, 104 ; GOLDSTEIN, 84). Ce chiffre peut augmenter après une surcharge mécanique prolongée, au cours d'une hypertrophie ventriculaire (HATT, 104 ; PAGE, 239).

In situ, les mitochondries sont orientées parallèlement à l'axe longitudinal de la cellule myocardique (MOORE et RUSKA, 199 ; HATT, 106). Entre deux myofibrilles voisines, on trouve une rangée de mitochondries interrompues que rarement par les structures du reticulum sarcoplasmique et quelques gouttelettes lipidiques. Le

contact aussi étroit entre les mitochondries et les myofibrilles semble être vital pour le maintien de la fonction principale de la cellule cardiaque, la contraction (cf. HATT, 106). Quant à la structure interne des mitochondries cardiaques fixées in situ, la caractéristique la plus remarquable est leur richesse en crêtes. A part quelques exceptions, (le muscle volontaire du canari, muscles dorsaux de certains insectes), les sarcosomes cardiaques montrent la plus grande surface de la membrane interne par rapport au volume mitochondrial (LEHNINGER, 166 ; PAGE, 239). Leur matrice est dense, contenant de nombreux "corpus intracristam" (aspect "condensé").

Le nombre des crêtes des mitochondries cardiaques varient sensiblement selon leur origine : dans les coeurs battant à très hautes fréquences (ventricule gauche du canari (SLAUTTERBACK, 307)) les images saisissantes ont été signalées. Cette richesse en crêtes témoigne sans doute d'une activité respiratoire considérable. Celle-ci est d'ailleurs suggérée par les données histochimiques (réactions à la SDH, MDH, α KGDH), et biochimiques (richesse de la membrane interne en flavoprotéines, cytochromes, etc.) (PEARSE, 248 ; RABINOWITZ, 367). In vitro, les mitochondries cardiaques montrent une respiration plus rapide (LEHNINGER, 166) que celle des autres tissus.

3. Aspects pathologiques.

Les modifications de l'ultrastructure des mitochondries cardiaques ont été signalées au cours de diverses conditions pathologiques. Les lésions les plus caractéristiques sont celles liées à une hypoxie aiguë (cf. HATT, 107 ; MÖLBERT, 195 ; BÜCHNER, 21). Après

quelques minutes d'une hypoxie sévère, on note un gonflement de la matrice (HATT, 107 - SULKIN, 321; ONISHI, 227), le nombre des corps intracristam diminue (HATT, 107 ; POCHE, 255, 256), et le volume des mitochondries augmente. Les crêtes toujours intactes se dessinent beaucoup plus nettement (aspect "orthodoxe") que dans les coeurs des témoins. Plus tard des altérations de la membrane interne peuvent apparaître, les crêtes sont fragmentées (HATT, 107 ; ONISHI, 227) et l'espace interne vacuolisé ("aspect hypoxique") (BÜCHNER, 21).

Des altérations similaires ont été décrites dans les coeurs ischémiques (JENNINGS, 121 ; HERDSON, 112 ; CAULFIELD , cf. 107 ; HEGGTVEIT, 111) où on trouve également à l'intérieur des mitochondries de nombreux dépôts d'un matériel opaque aux électrons (probablement des sels de calcium), et les images de ce type ont été considérées jusqu'alors comme preuve irréfutable d'un manque d'oxygène (JENNINGS, 121 ; BÜCHNER, 21 ; PELOSI, 249).

Les données récentes de HATT (cf. 107) et quelques autres laboratoires (POCHE, 255, 256) montrent clairement qu'une telle interprétation est trops simplifiée. Des altérations "hypoxic-like" des mitochondries ont été décrites dans de nombreuses conditions expérimentales pendant lesquelles une baisse de la pO_2 cellulaires est peu probable : surcharge mécanique (HATT, 104) perfusion sans calcium (BURGOS, 22) carence en Mg^{2+} (HEGGTVEIT, 110) ou vitamine E (VLEET, 333), intoxication du coeur par de fortes doses de catécholamines (FERRANS, 77 ; KORB, 142) ou de dinitrophénol (POCHE, 254).

De son côté, POCHE (255) a démontré que le coeur isolé de rat peut résister à une anoxie prolongée (30 min de perfusion par KREBS-HENSELEIT équilibré avec 95 % de N_2 + 5 % CO_2) sans la moindre modification de l'ultrastructure mitochondriale. Seule la disparition des grains intracristam a été observée. Cette résistance à l'hypoxie sévère peut cependant être diminuée au cours d'une perfusion sans substrat exogène (WEISSLER, 339). De même, il n'y avait pas dans les expériences de POCHE de lésions mitochondriales après perfusion de solutions dont la pCO_2 était artificiellement élevée (POCHE, 256). Il semble donc que, si l'hypoxie a pu être considérée comme la cause exclusive du gonflement mitochondrial, l'exclusivité d'une telle relation est discutable. Des lésions identiques peuvent apparaitre dans de nombreuses autres conditions dépourvues de toute altération de l'activité de la chaine respiratoire.

Nous avons cru utile de réexaminer le problème du gonflement mitochondrial en insistant sur les points suivants :

-a) Nécessité d'une fixation standardisée, mettant à l'abri des artéfacts.

-b) Quel est le rapport entre l'ultrastructure et l'état fonctionnel des mitochondries in situ ?

-c) La microscopie électronique est-elle la technique adéquate pour un "dépistage" d'une hypoxie tissulaire discrète ?

B. - ROLE PHYSIOLOGIQUE DES MITOCHONDRIES

1. Production d'énergie

Comme toutes les cellules vivantes, les cellules cardiaques sont en permanence soumises aux interventions nocives du milieu extérieur. Pour maintenir leur homéostasie, elles sont obligées de se défendre. Quel que soit le caractère de cette défense (osmotique, chimique, pH), elle exige un apport d'énergie. Les dépenses énergétiques encore plus importantes (85 % de dépenses totales) sont celles qui accompagnent la fonction la plus remarquable des cellules cardiaques : leur contractilité (CHALLONER, 30 ; KLOCKE, 138).

Il a été calculé (BURTON, 23) que le travail cardiaque externe (exprimé comme produit de la pression intraventriculaire et du débit systolique) d'un coeur humain au repos était d'environ 1,06 Joules. Pendant l'exercice, le travail externe augmente et le turnover énergétique nécessaire au maintien des performances cardiaques doit être encore plus important, car le rendement du muscle cardiaque est assez bas (20 %) (RUSHMER, 286).

L'énergie nécessaire au maintien des fonctions cellulaires vitales doit être présente sous une forme accessible, facilement utilisable. Il est bien admis actuellement que la molécule jouant le rôle essentiel dans les échanges énergétiques cellulaires est celle de l'ATP, dont la plus grande partie est d'origine mitochondriale. L'organisation structurale et fonctionnelle du complexe enzymatique impliqué dans la synthèse de l'ATP et la respiration a fait l'objet de nombreuses études

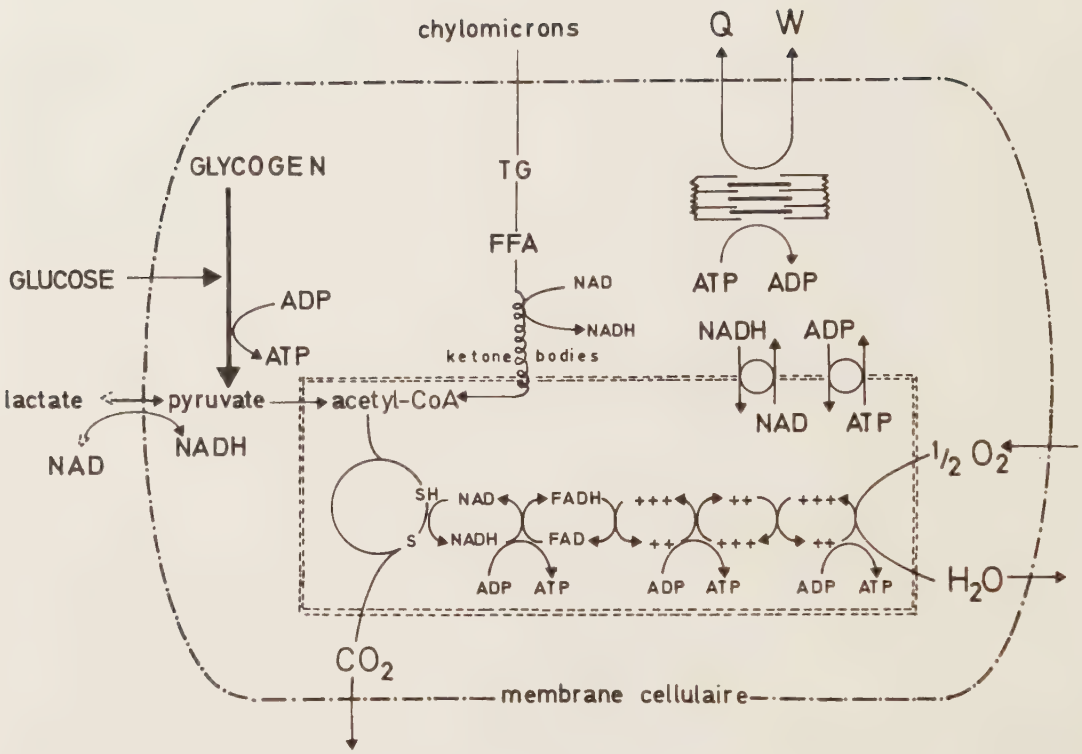


FIG. 2. SCHEMA DU METABOLISME INTERMEDIAIRE : Interactions des différentes voies métaboliques impliquées dans le maintien des flux d'énergie et de la matière entre la cellule et le milieu ambiant.

depuis une trentaine d'années (KREBS, 152 ; GREEN, 87 ; LEHNINGER, 165). Quelques aspects fondamentaux de ce système ont ainsi été élucidés (SLATER, 304, 305 ; CHANCE, 36 ; LEHNINGER, 166 ; ERNSTER, 71).

- a) Chaine respiratoire

Les électrons apportés par les divers substrats sont captés par le NAD ou les flavoprotéines qui les transmettent aux autres coenzymes respiratoires (ubiquinone, cytochromes) pour qu'ils soient finalement acceptés par l'oxygène. Cette voie commune à tous les électrons des différents substrats est connue comme la chaine respiratoire (CHANCE, 33). Son schéma actuel est le suivant (Fig. 3).

Le NAD et le NADP ont été découverts respectivement par HARDEN et YOUNG (cf. 166) et par WARBURG (cf.127). Ils absorbent à 260 nm grâce au groupement adénine, et après la réduction du cycle aromatique du nicotinamide, il apparait un autre pic à 340 nm. Simultanément, il y a une émission fluorescente (maximum entre 440 - 480nm) au cours de cette réduction (CHANCE, 39 ; THOREIL, 37). Ce comportement optique particulier aux pyridine nucléotides s'est montré très avantageux car il a permis d'étudier la fonction de la chaine respiratoire in situ (CHANCE, 36 ; KOHEN, 140 ; JÖBSIS, 124 ; ERECINSKA, 70).

Les flavoprotéines ont été isolées par WARBURG et purifiées par GREEN (cf. 166). Ils ont deux pics d'absorption assez caractéristiques à 370 et 450 nm (LEHNINGER, 166). Au cours de leur réduction, le pic de 450 nm diminue et il en est de même avec l'émission fluorescente à 570 nm (CHANCE, 35). Ils acceptent des électrons du NADH, du succinate ou des acides gras pour

les transmettre plus loin aux cytochromes ou à l'ubiquinone. Il semble qu'il y ait toute une série de différentes FP dont chacune est attachée à une deshydrogénase particulière, substrat spécifique. Le degré de réduction des flavoprotéines varie en fonction de la vitesse de la respiration (CHANCE, 36). Il dépend également de la quantité du substrat disponible (CHAPMAN, 48).

Les cytochromes sont des protéines contenant, comme groupe prosthétique, un héme (noyau composé d'un fer et de 4 porphyrines) très similaire à celui de l'hémoglobine. Les changements de la valence du fer leur permettent le transport des électrons vers la cytochrome oxydase (cyt. a3) qui, seule, peut les transmettre à l'oxygène.

Au moins cinq cytochromes distincts ont été identifiés (cyt. b,c,c1,a,a3) dont chacun est caractérisé par 3 pics d'absorption (α, β, γ) (KEILIN, 130). Les spectres d'absorption des cytochromes des différentes espèces animales et végétales sont strictement identiques. Cela prouve qu'il s'agit de protéines très vieilles, dont la structure et la fonction ont été déterminées tôt dans la phylogenèse (130, 168). Au cours des transitions d'oxydoréduction, quand la valence du fer change, les spectres d'absorption de chaque cytochrome varient quantitativement. Cette propriété persiste également in situ, ce qui a permis à CHANCE de mettre en évidence des fluctuations du potentiel redox des cytochromes au cours des transitions respiratoires des mitochondries isolées (31, 35, 46) et dans les organes intacts (37, 45). Cette technique a été sensiblement améliorée par LÜBBERS et NIESSEL (53, 134) qui ont développé un spectrophotomètre à balayage rapide permettant d'étudier in situ la dynamique des transitions métaboliques.

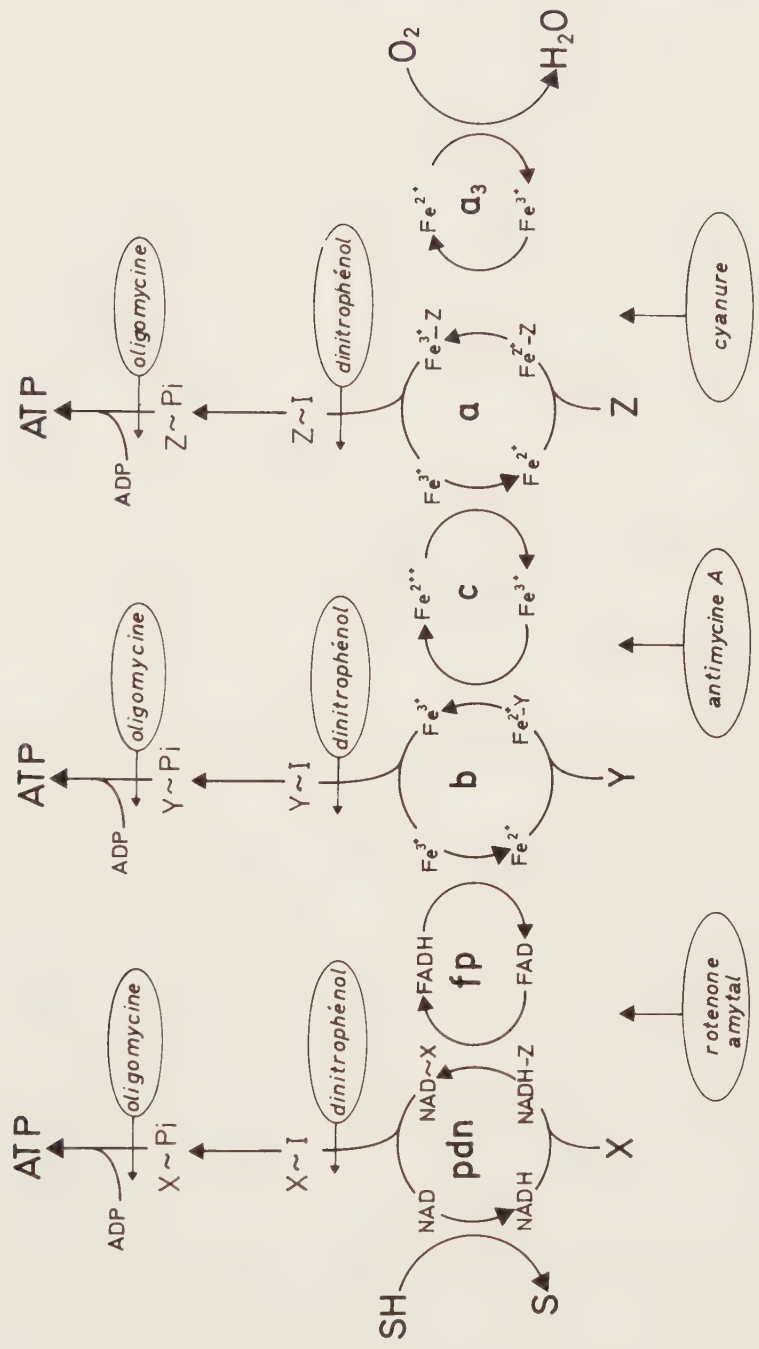


FIG. 3. SCHEMA DE LA CHAINE RESPIRATOIRE : à noter la séquence des coenzymes respiratoires, l'existence de trois sites de phosphorylation, le lieu d'action des divers inhibiteurs.

A côté de toutes ces molécules, impliquées essentiellement dans le transport des électrons du substrat à l'oxygène, un certain nombre de "coupling factors" a été proposé (LEHNINGER, 166). Deux d'entre eux ont été identifiés : une ATPase de poids moléculaire de 280.000 (facteur F_1 de RACKER, 264) et l'enzyme chargé de la dernière réaction d'oxydation phosphorylante (facteur F_o, sensible à l'oligomycine, RACKER, 263). Les facteurs hypothétiques X, Y, Z assurent, de leur côté la première étape de l'oxydation phosphorylante (LEHNINGER, 166). Leur existence était suggérée par les résultats obtenus après l'emploi de différents inhibiteurs métaboliques, tels que l'oligomycine, le dinitrophénol, l'antimycine A, etc. (Fig. 3).

- b) Energétique du transport des électrons, oxydation phosphorylante.

Quand les électrons sont transportés d'une substance à l'autre, on parle d'une réaction d'oxydoréduction. La force motrice d'une telle réaction (la force électromotrice) est le résultat de $\Delta E°$, différence entre les potentiels standards d'oxydoréduction du donneur et de l'accepteur d'électrons.

Si on mesure les $E°$ des divers membres de la chaine respiratoire, on constate une décroissance progressive entre le NAD et l'oxygène, le premier étant plus négatif que le dernier. Cela explique pourquoi le transfert des électrons le long de la chaine respiratoire est quasi unidirectionnel (dans le sens de la diminution de l'énergie libre $\Delta G°$, conformément à la 2ème loi de la thermodynamique).

Il y a autrement dit, au cours du transport

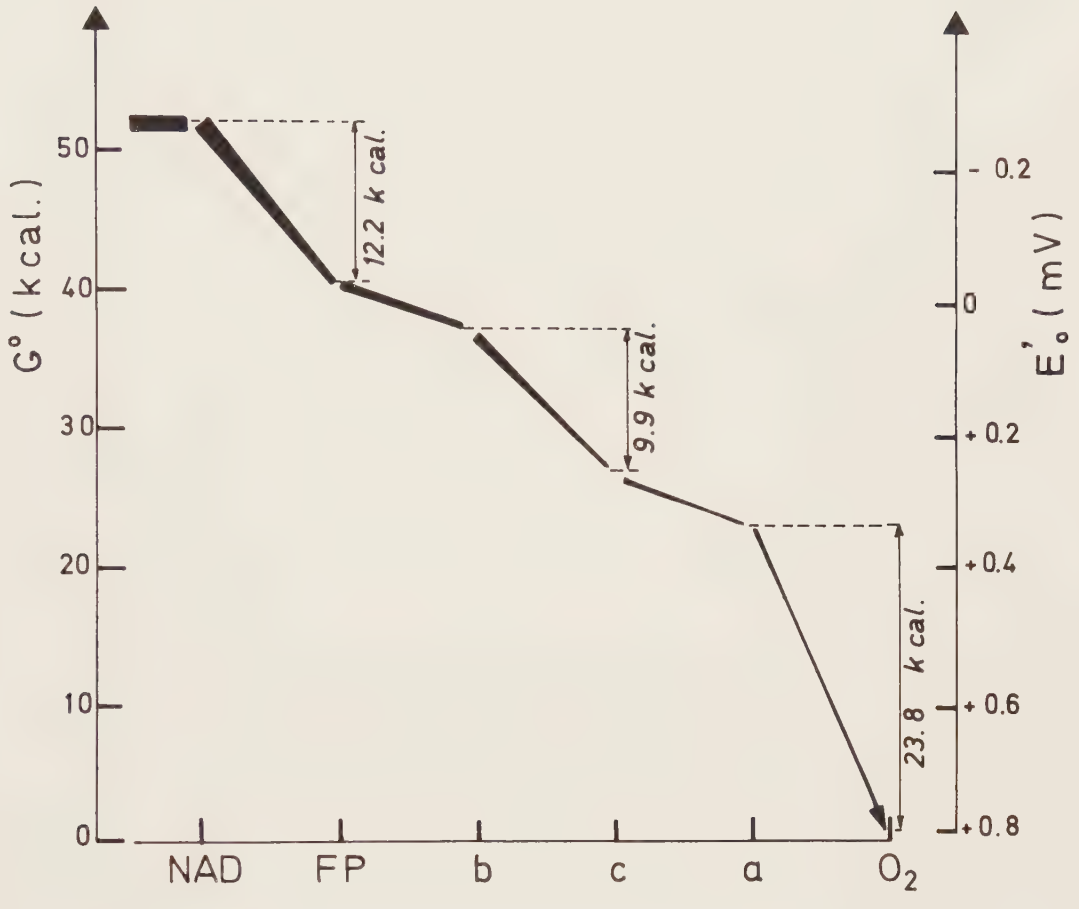


FIG. 4. DIMINUTION DE L'ENERGIE LIBRE DU NADH AU COURS DU TRANSPORT DES ELECTRONS PAR LA CHAINE RESPIRATOIRE (selon LEHNINGER).

A noter : existence des trois sites de couplage (G° supérieur à 7 kcal), responsables de la valeur théorique du rapport ADP/O égale à 3.

des électrons par la chaine respiratoire une libération d'énergie qui est égale à 52,0 kcal pour l'oxydation d'une molécule de NADH. Cette énergie est répartie de la façon suivante (Fig. 4).

On peut remarquer qu'il y a au niveau de la chaine respiratoire trois endroits où le ΔG° est plus grand que 7 kcal, valeur habituellement considérée comme l'énergie libre d'une mole d'ATP (LIPMAN, 174). Il a été effectivement démontré en 1951 (LEHNINGER, 165) que le nombre de molécules d'ATP synthétisées au cours d'un passage d'une paire d'électrons tout le long de la chaine respiratoire est égal à 3. Seules deux moles d'ATP sont synthétisées par 1 mole de substrats FAD dépendants et 1 seule en présence d'ascorbate qui est oxydé directement par la cytochrome oxydase (33, 44, 166). Le rapport P/O des mitochondries intactes peut donc varier entre 1 et 3, selon le substrat utilisé. Le rendement énergétique de l'oxydation du NADH est à l'état normal de 21/52 x 100 soit 40 % environ. Il peut diminuer sous l'influence de nombreuses drogues dont le représentant le plus connu est le dinitrophénol. L'action physiologique de certaines hormones (thyroxine, catécholamines) s'explique également par une diminution du rapport P/O (MICHEL, 190 ; SOBEL, 310).

Si le couplage entre la respiration et la phosphorylation a été postulé déjà en 1930 (ENGELHARDT, cf. KALCKAR, 127) et son existence expérimentalement mise en évidence par LEHNINGER 20 ans plus tard (1944-1951), son mécanisme reste toujours mal compris. L'utilisation des divers inhibiteurs de l'oxydation phosphorylante (dinitrophénol, oligomycine, valinomycine) a permis néanmoins de reconstituer un schéma des réactions impliquées dans les transformations énergétiques de la

chaine respiratoire qui est le suivant (Fig. 3).

On peut noter parmi les divers facteurs impliqués dans le couplage de l'oxydation et la phosphorylation, dont certains ont été déjà isolés (RACKER, 263), un intermédiaire X∼I, composé "riche en énergie", qui jusqu'à présent échappe à toute tentative d'isolement et de purification. Il a été successivement représenté comme 1) une substance hydrophobe "riche en énergie", peu stable dans les milieux aqueux (SLATER,304),

2) une structure dont la conformation peut varier entre deux états, un étant "riche en énergie" (BOYER, 14 ; GREEN, 89),

3) un gradient de pH ou un gradient ionique au niveau de la membrane interne (MITCHEL et MOYLE, 192).

Hypothèse chimique de l'oxydation phosphorylante

Selon cette hypothèse (304, 163), l'énergie libérée au cours de la respiration est utilisée pour créer une liaison covalente entre le transporteur d'électron (A) et une substance hypothétique (I). Le complexe A∼I serait ensuite hydrolysé dans une série de réactions pour donner finalement de l'ATP à partir du phosphore inorganique et de l'ADP, ceci en 3 sites bien précis de la chaine respiratoire (Fig. 3).

$$AH_2 + B + I \underset{\text{dinitrophénol}}{\rightleftharpoons} A\sim I + BH_2 \quad (1)$$

$$A\sim I + X \rightleftharpoons A + X\sim I \quad (2)$$

$$X\sim I + Pi \rightleftharpoons I + X\sim P \quad (3)$$

$$X\sim P + ADP \underset{\text{oligomycine}}{\rightleftharpoons} X + ATP \quad (4)$$

La formation du A∼I est rendu impossible par le dinitrophénol, ou par un autre découplant, ce qui explique l'augmentation de la QO_2 et la diminution du rapport P/O (Van DAM, 145 ; PINNA et MORET, 252). La dernière réaction, transphophorylation, est inhibée par l'oligomycine (LEHNINGER, 166 ; PINNA et MORET, 252) d'où résulte le ralentissement de la respiration observée sous l'effet de cette drogue (WEBER, 336) et de ses analogues (PULLMAN, 260).

Il faut remarquer que ce schéma de l'oxydation phosphorylante est purement hypothétique. L'existence des divers intermédiaires, tels que X∼I, A∼I, n'a jamais été prouvé (PULLMAN, 260 ; LEHNINGER, 166). Une des raisons possibles d'un tel échec pourrait être leur faible stabilité dans des milieux aqueux couramment utilisés (SLATER, cf. 163), car il ne faut pas oublier que le processus de l'oxydation phosphorylante est étroitement lié aux structures hydrophobes lipoprotéiques de la membrane interne (LEHNINGER, 166, 168).

Hypothèse chemioosmotique de l'oxydation phosphorylante

Cette hypothèse a été formulée initialement par MITCHELL et MOYLE (183) et modifiée depuis lors dans plusieurs autres laboratoires (PRESSMAN, 54 ; CHAPPELL, cf. 163). Selon ces auteurs l'énergie libérée par la chaîne respiratoire est stockée sous forme d'un gradient de pH (MITCHELL, 274) ou d'un gradient ionique (PRESSMAN, 54) au niveau de la membrane interne. Les considérations thermodynamiques (MITCHELL, 194) plaident en faveur de la possibilité que l'ATP est synthétisé grâce à la décharge de ce gradient et à l'action catalytique de l'ATPase mitochondriale (MITCHELL, 192) (Fig. 5).

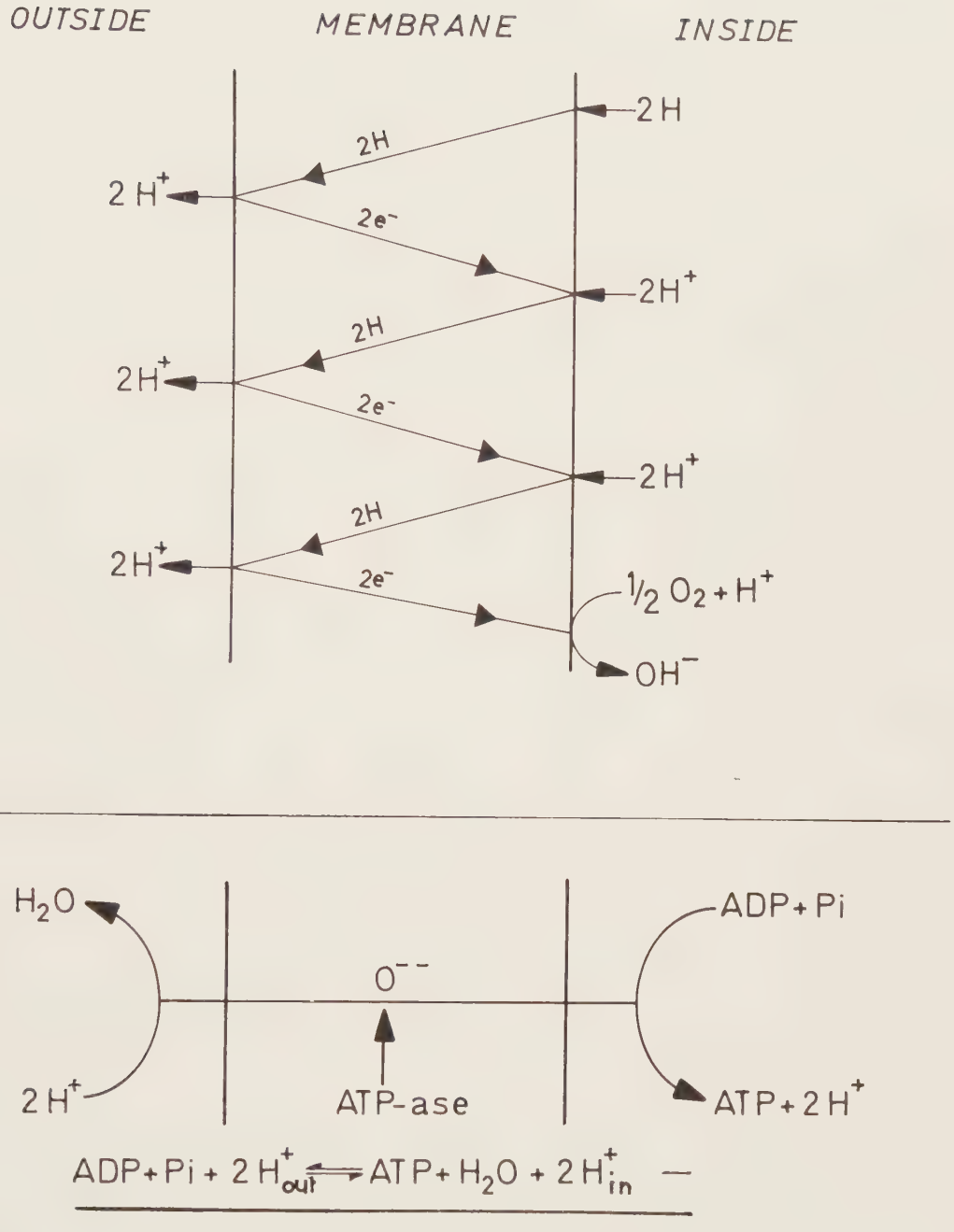


FIG. 5. MECANISME CHEMIOSMOTIQUE DE LA SYNTHESE D'ATP AU NIVEAU DE LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE :

expulsion des protons au cours de la respiration (schéma du haut) et synthèse d'ATP par la réversion de l'ATPase mitochondriale (schéma du bas) (Selon MITCHELL et MOYLE).

Les conditions préalables pour que cette hypothèse soit retenue sont les suivantes : 1) imperméabilité de la membrane interne aux protons, 2) expulsion active de 3 protons au cours de l'oxydation d'un NADH, 3) augmentation de la perméabilité pour les protons sous l'influence de drogues découplantes, 4) existence d'une synthèse d'ATP en l'absence de la respiration après acidification du milieu d'incubation (MITCHELL et MOYLE, 193).

L'existence d'un potentiel de pH au niveau de la membrane mitochondriale a été expérimentalement démontrée par ADDANKI (2, 3). Selon lui, le $\Delta G°$ du gradient de pH créé au cours de l'oxydation d'une mole de NADH est suffisamment grand pour assurer la synthèse de 3 moles d'ATP. Le dinitrophénol diminue ce potentiel (ADDANKI,2,3) et augmente la perméabilité des mitochondries pour les protons (MITCHELL, 191 ; CHAPPELL, cf. 163), les perméabilités pour le potassium et le chlore restent inchangés (HARRIS, cf. 162). Enfin, JAGENDORF (120) a constaté qu'un changement brusque de pH peut être accompagné par la synthèse de l'ATP par les chloroplastes. Des résultats similaires ont été obtenus avec les mitochondries par REID (274).

Malgré toutes ces preuves en sa faveur, la théorie chemiosmotique n'est pas acceptée à l'unanimité. De nombreuses expériences prouvent que les mouvements transmembranaires des protons sont beaucoup plus complexes. CHANCE et MELLA (41) ont montré que l'éjection des protons qui accompagne la respiration est très faible si la concentration des cations dans le milieu d'incubation reste basse (moins de 5m/umole/mg de protéine mitochondriale). En effet de nombreux auteurs ont démon-

tré que la captation des divers cations, notamment celle du Ca^{++} et du K^{++}, s'accompagne d'une expulsion de protons (CHANCE, 34 ; LEHNINGER, 166 ; ROSSI, 282 ; DRAHOTA, 66). On peut se demander dans quelle mesure les mouvements de H^{+} qui accompagnent la respiration ne sont pas secondaires aux transports ATP-dépendants des cations présents dans le milieu d'incubation (COCKRELL, 54 ; CHANCE, 41, 34 ; CHAPPELL, 51).

Un autre argument refutant le mécanisme chémiosmotique de l'oxydation phosphorylante est l'existence de trois sites de phosphorylation situés entre NAD et P F (site I), cyt. b et cyt. c (site 2) et cyt. a_3 et l'O_2 (site 3) (CHANCE, 70 ; SLATER, 304). La théorie chemiosmotique, telle quelle a été présentée par MITCHELL (192, 193) explique mal comment cette stoïchiométrie peut être maintenue.

Théorie mécanochimique de l'oxydation phosphorylante.

Un autre mécanisme de l'oxydation phosphorylante a été proposé par BOYER (14). Cet auteur remplace le composé spécifique "riche en énergie" de la théorie chimique par un "changement conformationnel" d'une protéine impliquée dans le transport des électrons. Selon GREEN (89, 99) et HACKENBROCK (95, 96, 97) il pourrait s'agir d'un changement ultrastructural de la membrane interne même. La différence d'énergie libre entre les deux états conformationnels permettrait la captation de l'énergie libérée au cours de l'oxydation du NADH et son utilisation consécutive au cours de la phosphorylation de l'ADP et des transports ioniques (GREEN, 89, 99).

L'existence de trois sites spécifiques de phosphorylation n'est pas essentielle pour les défenseurs de cette théorie (BOYER, 14). Ceci contraste avec de nombreuses preuves d'une stoichiométrie plutôt rigoureuse de l'oxydation phosphorylante (36, 165). La possibilité que les changements conformationnels observés par GREEN (4, 99) et HACKENBROCK (95, 96) sont secondaires aux mouvements ioniques impliqués dans l'oxydation phosphorylante a été évoquée par BLAIR (336) et GRAHAM (85). La ressemblance entre le gonflement osmotique (BRIERLY, 116 ; GREENAWALT, 90) et méchanochimique (HACKENBROCK, 95, 96 ; GREEN, 89) est en effet frappante.

En conclusion, les trois hypothèses se disputent toujours la priorité qui ne peut être donnée à aucune d'entre elles (PULLMAN, 260), car un refus catégorique d'un des mécanismes proposés n'est pas possible. Ils peuvent d'ailleurs facilement coexister : la formation d'une liaison "riche en énergie", terme qui est d'ailleurs contesté par certains auteurs (ATKINSON, 5 ; LEHNINGER, 168) peut impliquer un changement conformationnel (DUPRAW, 68). De même les transports ioniques au travers de la membrane mitochondriale peuvent être accompagnés de modifications ultrastructurales (WILSON et DUTTON, 356) et de l'apparition temporaire de complexes "ion-enzyme" (CHANCE, 42), ayant des caractères des composés "riches en énergie". (LIPMAN, 174).

Il semble donc que seule la coexistence pacifique des trois mécanismes soit capable d'expliquer le procédé de l'oxydation phosphorylante. La paix des armes entre les défenseurs des diverses théories ne ferait que faciliter notre compréhension de ce processus vital.

- c) Contrôle de l'activité de la chaine respiratoire.

Les mitochondries des cellules intactes ainsi que les mitochondries isolées reçoivent du milieu extérieur de nombreuses substances : oxygène, divers substrats, ADP et phosphore inorganique. Elles fournissent à l'extérieur de l'eau, du CO_2 et de l'ATP. Elles répondent ainsi à la définition des "systèmes ouverts". Comme tels,elles se trouvent dans un état stationnaire dynamique, caractérisé par l'égalité des flux entrants et sortants des substances définies ci-dessus. En fait, elles ne sont jamais en équilibre thermodynamique (KREBS, 151 ; ATKINSON, 5). Cette qualité représente un grand avantage en biologie, car ce ne sont que les systèmes ouverts qui sont capables de fournir un travail à l'extérieur, les performances maximum étant déterminées par la tendance à atteindre l'équilibre. De plus, ce n'est qu'un système,qui se trouve en dehors de l'équilibre,qui peut être soumis à un contrôle et à une régulation de ses performances (KATCHALSKY, 128). Le rôle de divers facteurs extra-mitochondriaux (pH, concentration des ions et des substrats etc.) dans le contrôle des fonctions mitochondriales n'est donc pas surprenant. Les mécanismes de ce contrôle ont été étudiés par de nombreux laboratoires au cours des décades passées (CHANCE, 36 ; ERNSTER, 71 ; GREEN, 87, 89 ; KLINGENBERG, 131 ; LEHNINGER, 165 ; RACKER, 262 ; SLATER, 304 ; VIGNAIS, 17, 330). Les informations que l'on peut tirer ce ces travaux ne sont que partielles, car en travaillant in vitro, sur les culots des mitochondries isolées, on néglige complètement le rôle des interactions mitochondrio-cytosoliques existant in situ. Néanmoins, les notions les plus importantes sont les suivantes.

En regardant la réaction globale de l'oxydation de l'acétate par le cycle de KREBS et la chaine respiratoire :

$$\text{acétate} + 2O_2 \rightleftharpoons 2CO_2 + 14H_2O$$

on pourrait croire que selon la loi des masses, la vitesse de ce processus est déterminée par l'apport du substrat et celui de l'oxygène. Mais ce n'est qu'au cours de conditions pathologiques que le taux de substrat endogène ou la pO_2 intracellulaire deviennent les facteurs limitant de la respiration, les deux se trouvent normalement en excès. Les fluctuations fines de la vitesse de la respiration qui reflètent sensiblement les changements du turnover énergétique cellulaire sont liées essentiellement au "phosphate potential" (KLINGENBERG, 134, 135) ou "adenylate charge" (ATKINSON,5), car la respiration mitochondriale est étroitement liée à la phosphorylation de l'ADP :

$$\text{acétate} + 12\ Pi + 12\ ADP + O_2 \rightleftharpoons 2CO_2 + 14H_2O + 12\ ATP$$

En effet, en 1956, CHANCE et WILLIAMS (36) ont établi le rôle important de d'ADP dans le contrôle de la respiration. Plus tard, KLINGENBERG (131) et CHANCE (38) ont signalé une inhibition de la respiration par l'adénosine triphosphate. En présence de succinate et d'un excès d'ATP, ces auteurs ont vu également une inversion du transport des électrons caractérisée par la réduction du NAD.Toute accélération de la respiration s'accompagne par contre d'une oxydation des pyridine nucléotides et des autres coenzymes respiratoires. Leurs expériences prouvent que la vitesse de la respiration et l'état redox des coenzymes respiratoires sont finement contrôlés par le rapport ATP/ADP + Pi, appelé "phosphate potential"

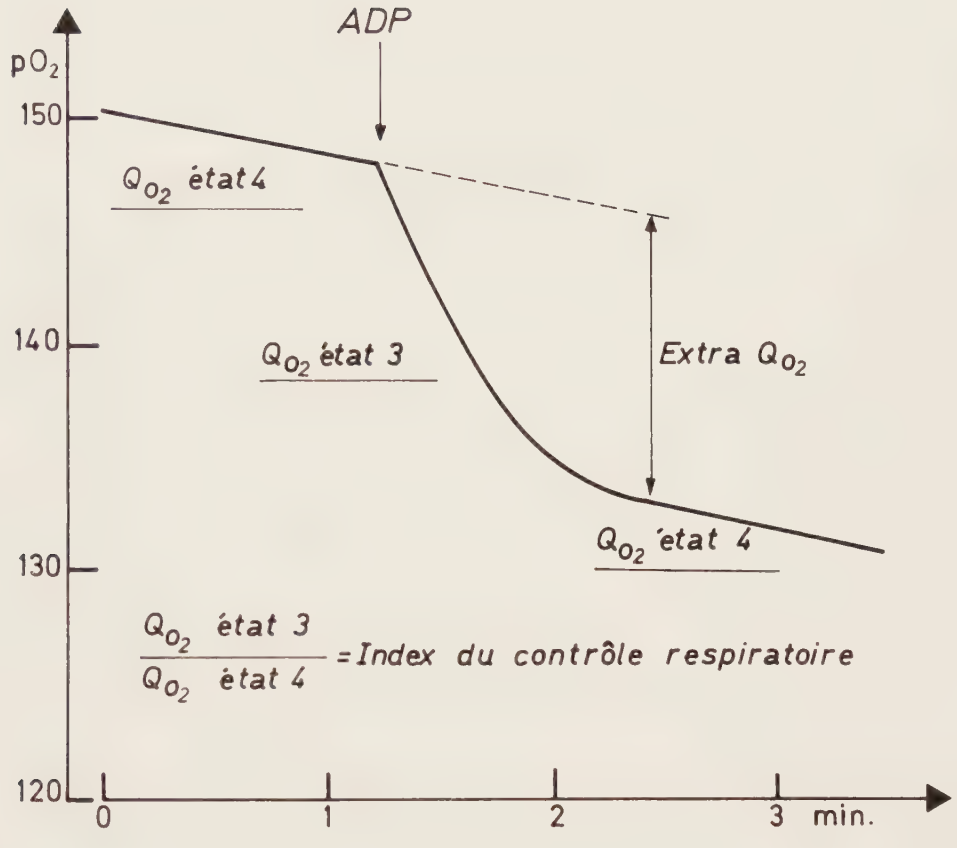


FIG. 6. AUGMENTATION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE DES MITOCHONDRIES ISOLEES PAR ADDITION D'ADP EXOGENE ; CONTROLE RESPIRATOIRE (selon B. CHANCE).

par KLINGENBERG (134) ou "adenylate charge" par ATKINSON (5).

L'accélération de la chaine respiratoire après l'addition d'ADP exogène (Fig. 6) est devenu un test très important de l'état fonctionnel des mitochondries isolées (index du contrôle respiratoire de CHANCE et WILLIAMS (36). Les relations qui existent entre la vitesse de la respiration et le degré de réduction des coenzymes respiratoires ont été étudiés en détail par CHANCE (35). A l'aide de techniques spectrométriques raffinées, il a pu démontrer que les coenzymes respiratoires se trouvent dans un état stationnaire dynamique, caractéristique (CHANCE et WILLIAMS, 36). Les coenzymes les plus proches du substrat (source d'électron) sont en grande partie réduits. Ceux qui se trouvent du côté de l'oxygène sont relativement oxydés. Il y a donc le long de la chaine respiratoire un gradient de réduction dont la pente varie sensiblement en fonction de la vitesse de la respiration (Fig. 7).

Certains auteurs (CHANCE, 37 ; JÖBSIS, 125 ; LÜBBERS, 180) ont exploité ce phénomène pour étudier les transitions fonctionnelles des mitochondries mettant au point des techniques optiques qui permettent de suivre les fluctuations du potentiel redox de la chaine respiratoire in situ.

Nous avons essayé d'appliquer les techniques fluorimétriques et spectrométriques de CHANCE (43) et LÜBBERS (179) à l'étude des fonctions mitochondriales du coeur isolé au cours des divers états fonctionnels (hypoxie, hyperoxie, épreuves pharmacologiques).

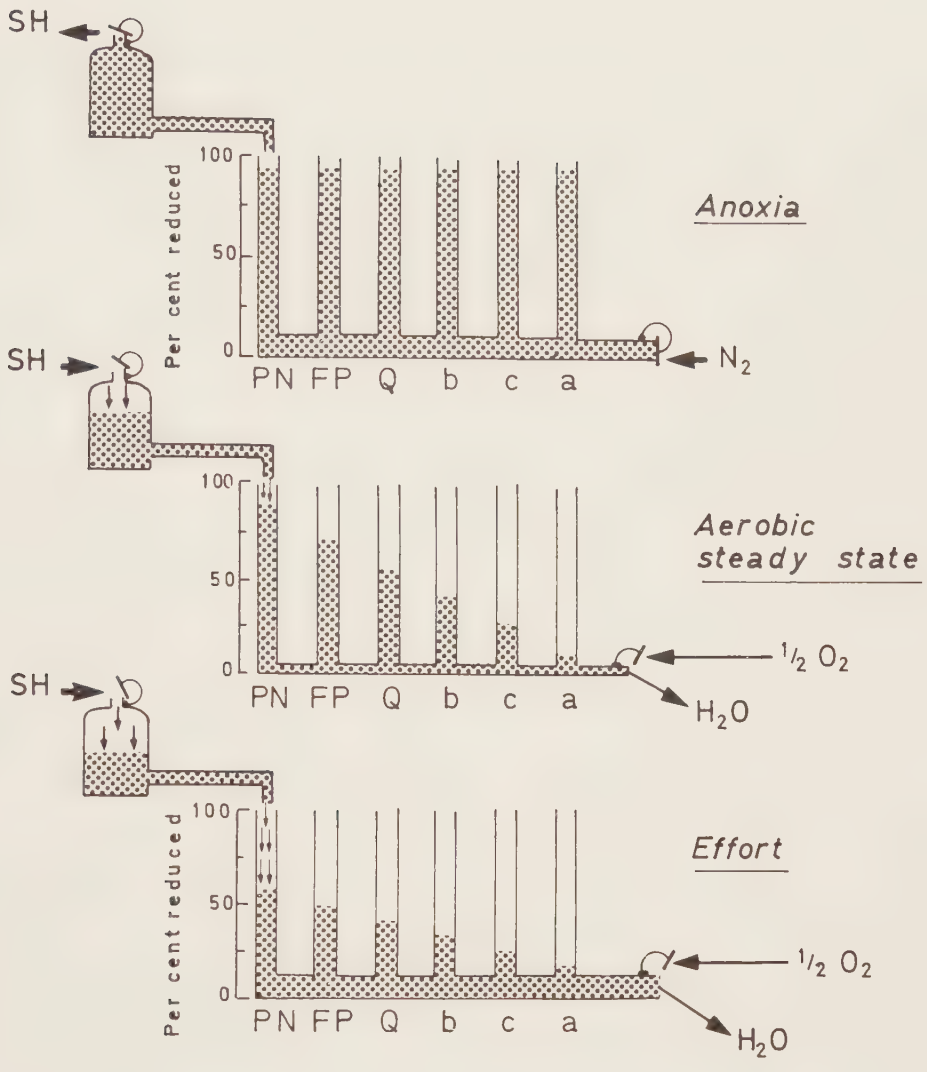


FIG. 7. CORRELATION ENTRE LA VITESSE DE TRANSPORT DES ELECTRONS ET LE DEGRE DE REDUCTION DES COENZYMES RESPIRATOIRES (modèle hydraulique selon A. LEHNINGER).

- d) Production mitochondriale d'énergie et libération de chaleur par le myocarde.

Les physiologistes du muscle cardiaque, intéressés essentiellement par les aspects thermodynamiques du travail cardiaque (MOMMAERTS, 196 ; GIBBS, 83 ; MARECHAL, 184 ; ABBOT, 1) distinguent différentes "chaleurs" qui accompagnent la contraction cardiaque (resting heat, activation heat, shortening heat, tension dependent heat, relaxation heat, HILL (113)). La source de cette énergie thermique libérée par le muscle doit être l'hydrolyse de l'ATP et de ses analogues par des protéines contractiles (BARANY, 7 ; ENGELHARDT, cf. 127) et le reticulum sarcoplasmique (MOMMAERTS, 196), car on travaille en général à 4°C en absence de toute respiration (HILL, 113 ; MOMMAERTS, 196).

In vivo, à 37°C, une grande fraction de la chaleur dégagée par le muscle est certainement d'origine mitochondriale, car une augmentation du turnover du catabolisme aérobie est une des conséquences immédiates de la contraction musculaire (state 4-to-3 transition de CHANCE) (36). Aucune tentative n'a été faite jusqu'à présent pour quantifier la production thermique mitochondriale au cours de la contraction. La question pourra peut être remise à jour dès que nous aurons les moyens techniques permettant d'étudier la cinétique de la respiration du muscle intact en activité. Les premiers essais de quantification de la réponse métabolique à l'exercice musculaire ont été réalisés dans les laboratoires de JÖBSIS (123, 124), STAINSBY (125) et GIBBS (27, 83) (cf. p. 47 et Fig. 10).

2. Couplage de l'excitation-contraction

La libération de l'énergie du substrat et sa conversion en ATP sont étroitement liées aux transferts ioniques au travers de la membrane interne. Un grand nombre de translocases mitochondriales hautement spécifiques a été identifié (CHAPPELL, 51 ; KLINGENBERG, 251 ; LA NOUE 160, MEIJER, 188) et leurs propriétés tels que les besoins énergétiques, stoichiométrie, sensibilité aux divers inhibiteurs, etc... ont été définies (CHAPPELL, 51 ; KLINGENBERG, 250 ; WILLIAMSON, 161 ; VIGNAIS, 332). La majeure partie de ces travaux a été faite in vitro, sur les mitochondries isolées, car les moyens tehcniques permettant d'étudier les transports transmembranaires des mitochondries in situ restant limités (cf. MEIJER, 188). C'est pourquoi leur signification physiologique demeure mal comprise (VAN KORFF, 143 ; CARAFOLI, 27).

Au niveau du muscle cardiaque, parmi les divers transferts ioniques deux sont particulièrement importants : 1) la captation mitochondriale du calcium, comme facteur peut être impliqué dans le maintien de la contractilité (LEHNINGER, 169 ; CARAFOLI, 27 ; PATRIARCA,245). 2) Les transferts de certains anions, métabolites du cycle de KREBS, nécessaires à l'intégration des diverses voies métaboliques des cellules cardiaques (LOWENSTEIN, 177 ; WILLIAMSON, 289 ; RANDLE, 271).

Captation du calcium par les mitochondries cardiaques.

Comme tous les muscles rouges, le coeur est très riche en mitochondries (HATT, 106 ; Mac CALLISTER, 239 ; RABINOWITZ, 367). Son reticulum sarcoplasmique lis-

se est, par contre peu développé (MOORE et RUSKA, 199 ; HATT, 106 ; KAUFMANN, 129). L'affinité de ce dernier pour le calcium est cinq fois plus faible que celle des microsomes musculaires (CARAFOLI, 27, 246). De ce fait, on conçoit actuellement les différences entre les deux tissus, quant au mécanisme du couplage excitation-contraction. Si le muscle squelettique peut assurer l'activation des protéines contractiles par les stocks de calcium intracellulaire, le coeur fait appel, pour maintenir ses performances, au calcium externe (CORABOEUF, 59 ; VASSORT, 328). La relaxation du muscle squelettique dépend entièrement du reticulum sarcoplasmique lisse (NAYLER, 215 ; WINEGRAD, 358 ; NIEDERGERKE, 224), dans le coeur le rôle des mitochondries a été évoqué (CARAFOLI, 27 ; PATRIARCA, 245 ; 246 ; LEHNINGER, 169).

Une grande affinité des mitochondries cardiaques pour le calcium a été, en effet, décrite par VASINGTON (326). De nombreux auteurs se sont attachés à étudier ce problème (LEHNINGER, 166 ; ROSSI, 282 ; DRAHOTA, 66 ; CHANCE, 34, 41), dont l'état actuel peut être résumé ainsi (CARAFOLI, 27) : il y a au moins deux différents mécanismes de la captation du calcium par les mitochondries isolées. L'un deux, actif, nécessite un approt d'énergie soit sous forme d'ATP, soit sous forme d'un substrat de la chaine respiratoire (DRAHOTA, 66 ; LEHNINGER, 166). Son affinité pour le calcium et sa capacité totale sont très élevées (K_M égal à 0,1 $/$uM, capacité égale à 0.1 - 3,0 $/$umoles de Ca^{++}/mg de protéines mitochondriales). L'addition de phosphore inorganique augmente énormément la quantité d'ions calciques stockés, car le phosphate précipite le calcium ionisé sous forme d'hydroxyapatite permettant ainsi le maintien

d'un gradiant de concentration entre le milieu d'incubation et la matrice mitochondriale (CHANCE, 34 ; ROSSI, 282). Les études dynamiques de CHANCE (35) et de CARAFOLI (27) suggèrent que la vitesse de la captation du calcium par ce système est suffisamment élevée pour assurer la relaxation. Quant à la vitesse de libération du calcium, aucune tentative expérimentale de la mesurer n'a été faite. Les arguments indirects (CARAFOLI, 27) excluent toutefois la possibilité d'une activation suffisamment rapide des protéines contractiles par ce mécanisme.

A côté de l'accumulation active du calcium, les ions calciques peuvent être passivement fixés par les groupements anioniques de la membrane mitochondriale (DRAHOTA, 66). L'affinité de ce système est assez basse (Km entre 0,1 - 0,01 mM), mais la réaction est extrèmement rapide (CARAFOLI, 27). Sa capacité totale (50 nmoles de Ca^{++}/mg de protéines mitochondriale) serait largement suffisante pour assurer les mouvements calciques liés à la contraction cardiaque, qui ne représentent que 2,5 nmoles de Ca^{++}/mg/contraction (CARAFOLI, 27).

Les deux mécanismes de la captation de calcium sont inhibés par le rouge de ruthénium (CARAFOLI, 27, 327 ; LEHNINGER, 166). Le transport actif est également sensible aux divers inhibiteurs métaboliques, tels que le dinitrophénol, l'oligomycine, etc. (LEHNINGER, 166 ; DRAHOTA, 66 ; CHANCE, 34). Tous ces inhibiteurs ont été habilement utilisés par GILLIS (cf. 27) qui, en travaillant sur les fibres dépourvues de membrane externe; a pu démontrer qu'un blocage du transport actif du calcium par le dinitrophénol ne modifie pas la cinétique du cy-

cle contractile. Par contre une relaxation prolongée apparait après le blocage par le rouge de ruthénium. Selon cet auteur (cf. 27) la fixation passive du calcium par les mitochondries pourrait jouer un rôle dans le couplage excitation-contraction des fibres cardiaques.

Il reste à déterminer quel est le rôle de la captation mitochondriale du calcium dans le maintien de la contractilité du muscle cardiaque intact. PATRIARCA et CARAFOLI (245) ont démontré, en effet, une grande affinité pour le ^{45}Ca des mitochondries cardiaques in situ. Selon ces auteurs les mitochondries joueraient le rôle d'un "tampon", nécessaire au maintien des concentrations physiologiques du calcium libre à l'intérieur des cellules. Les variations rythmiques de la concentration du Ca^{++} au niveau des protéines contractiles pourraient être assurées par l'action concertée de plusieurs structures cellularies, tels que le sarcolemme, le reticulum sarcoplasmique lisse, les mitochondries. La possibilité que certaines des protéines structurales du sarcomère se comportent comme échangeurs d'ions n'est également pas exclue (EBASHI, 69 ; LANGER, 158).

Il y a un autre aspect de la captation du calcium par les mitochondries, très discuté par certains auteurs (RONA, 280 ; FLECKENSTEIN, 76) : la relation entre le taux calcique intramitochondrial et le développement de la nécrose cellulaire. En effet, il a été démontré que le taux intracellulaire du calcium augmente au cours des diverses conditions expérimentales comme l'ischémie (JENNINGS, 121), l'administration de corticostéroïdes (SELYE, 299 ; BAJUSZ, 6), celle des catécholamines (BAJUSZ, 7 ; FLECKENSTEIN, 76), des trou-

bles électrolytiques (SELYE, 299 ; HEGGWEIT, 110). Au microscope électronique on trouve, outre les autres signes de souffrance cellulaire, des dépôts calciques intramitochondriaux (BLOOM, 13 ; FERRANS, 77 ; JENNINGS, 121).

Selon LEHNINGER (66, 166) et ROSSI (284) la captation du calcium par les mitochondries peut entrainer un découplage de l'oxydation phosphorylante, suivi par la diminution de la production d'ATP et la diminution du rapport ATP/ADP + Pi. Pour FLECKENSTEIN (76), BAJUSZ (6) et SELYE (299), le mécanisme de nombreuses nécroses "non ischémiques" pourrait être expliqué par un défaut de la distribution intracellulaire du calcium conduisant à une diminution de la production d'ATP par les mitochondries.

HATT et coll. ont rencontré des dépôts calciques intramitochondriaux dans les stades avancés d'une hypokaliémie (MAURAT et HATT, 185), après intoxication par l'émétine (HATT et SWYNGHEDAUW, 103) et les catécholamines (MORAVEC et HATT, 200). On a du mal à trouver un mécanisme commun à toutes ces nécroses. Les dépôts calciques à l'intérieur des mitochondries nous paraissent plutôt un témoin non spécifique d'une souffrance cellulaire prolongée, que sa cause immédiate.

3. Contrôle du métabolisme intermédiaire

La complexité de l'ultrastructure des mitochondries n'est certainement pas un but en soit. Elle est exigée par leur fonction primordiale : la fabrication d'ATP. Comme il a été démontré par KLINGENBERG (132, 134) l'existence d'une barrière semi-perméable, capable de

maintenir les gradients de concentrations des divers substrats entre les deux compartiments cellulaires modifie énormément le bilan énergétique de la cellule.

- a) Transport transmembranaire des adénine nucléotides

In vitro, les concentrations des formes riches et pauvres en énergie des adenyl nucléotides sont très différentes entre la matrice et le milieu d'incubation (KLINGENBERG, 136). KLINGENBERG (134, 136) a trouvé expérimentalement que le rapport ATP/ADP. Pi intramitochondrial était égal à 0,54, celui du milieu d'incubation variant entre 28 et 88 selon les conditions métaboliques. La différence des deux "adenylate charges" (ATKINSON,5) est environ de 1 : 100. Le même résultat a été obtenu par KREBS (113, 116) qui a essayé de calculer les deux rapports à partir de la Keq des deshydrogénases ATP - NAD dépendantes et des concentrations de leurs substrats dans des extraits tissulaires (glycerophosphate-DH pour le cytosol, β-OH-butyrate-DH pour les mitochondries) (KREBS et VEECH, 153).

A première vue, il est évident que le taux faible d'ATP à l'intérieur des mitochondries favorise sa synthèse. Son taux élevé dans le cytosol est par contre en faveur de son hydrolyse :

$$ATP + HOH \rightleftharpoons ADP + Pi$$

Une autre conséquence de la distribution non-homogène des deux formes d'adényl nucléotide est la différence de l'énergie libre (ΔG) du système ATP/ADP dans les deux compartiments (DU PRAW, 68 ; KLINGENBERG,134).

Contrairement au $\Delta G°$, qui est une valeur constante, déterminée une fois pour toutes dans des conditions strictement standardisées (LEHNINGER, 168 ; SLATER, 306), le ΔG (retrouvé à 25°) varie énormément avec le pH, la concentration du Mg^{++} et surtout en fonction des concentrations actuelles des réactants et des produits de la réaction :

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{(ATP)}{(ADP)(Pi)}$$

$$\Delta G = \Delta G° + 2.303\ RT \log \frac{(ATP)}{(ADP)(Pi)} \quad (166)$$

Selon KLINGENBERG (134, 136), la différence entre les deux ΔG peut atteindre 4 kcal : le coût de la synthèse mitochondriale d'ATP serait ainsi plus faible que l'énergie libérée au cours de son hydrolyse dans le cytosol. Une telle situation est évidemment tout à fait incompatible avec les lois de la thermodynamique classique (LEHNINGER, 168). Pour la comprendre, on doit tenir compte du bilan énergétique des transports transmembranaires des nucléotides de l'adénine (Fig. 8). Les échanges mitochondrio-cytosoliques de l'ATP et de l'ADP se font contre les gradients de concentration - ils sont donc actifs (KLINGENBERG, 132, 136 ; PFAFF, 250). Les équivalents énergétiques fournis par les mitochondries contiennent à la fois l'énergie de phosphorylation et celle du transport transmembranaire des protons qui accompagnent le translocation des adenyl-nucléotides (KLINGENBERG, 124) : l'énergie libre de l'ATP fabriquée par la chaine respiratoire augmente un peu au cours de son passage au travers de la membrane interne.

Le contenu énergétique de l'ATP cytosolique peut donc varier sensiblement en fonction des concentrations actuelles des deux nucléotides et celle du phosphore inorganique (133) . Les conséquences physiologiques d'une telle variabilité ne sont pas négligeables (KLINGENBERG, 136), car une baisse de l'"adenylate charge" (ATP/ADT + Pi) du cytosol devrait être accompagnée d'une diminution sensible de l'énergie libérée par chaque molécule d'ATP. Dans ces conditions, la cellule ne pourrait plus assurer les fonctions les plus coûteuses (ΔG très positif). La distribution hétérogène de l'ATP et de l'ADP à l'intérieur de la cellule est donc le facteur essentiel du contrôle du métabolisme énergétique cellulaire (KLINGENBERG, 133 ; DU PRAW, 68).

Les variations sensibles du rapport ATP/ADP + Pi peuvent apparaitre uniquement dans un des microcompartiments cytosoliques (NEWSHOLME, 222). Les fluctuations importantes des concentrations des deux formes d'adénine nucléotides au niveau des protéines contractiles (NEWSHOLME, 221) ou de la phosphorylase (KREBS, 150) ont été évoquées au cours d'un seul cycle cardiaque. Par conséquent, le ΔG de l'hydrolyse de l'ATP peut varier d'environ 3 kcal dans ces cas précis (NEWSHOLME, 221). Il semble qu'il s'agit là d'un des mécanismes du contrôle énergétique dont disposent les cellules contractiles pourvues d'une activité rythmique (NEWSHOLME,222 ; HOLZER, 114).

Le mécanisme du maintien des gradients transmembranaires des deux nucléotides entre le cytosol et les mitochondries a été étudié dans de nombreux laboratoires (KLINGENBERG, 137 ; GUDBJARNASON, 92, 93 ; LEHNINGER, 166 ; VIGNAIS, 331, 332 ; GAUTHERON, 329). L'état actuel de nos connaissances concernant ce sujet est le suivant : (Fig.8).

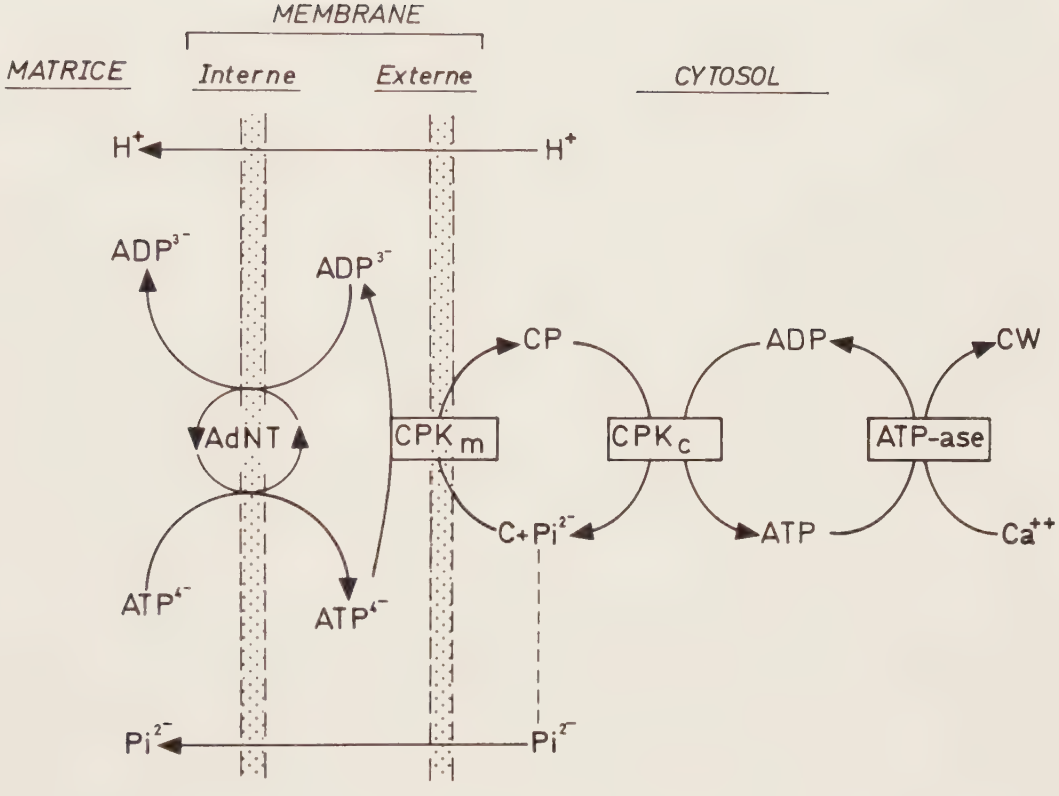


FIG. 8. FLUX DES EQUIVALENTS ENERGETIQUES AU TRAVERS DE LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE (selon M. KLINGENBERG).

AdNt - Adenylnucleotide translocase, CPK créatine phosphokinase, CW - travail cardiaque.

Depuis les travaux de LEHNINGER (166) nous savons que ni l'ATP ni l'ADP ne traversent facilement la membrane mitochondriale (119, 137, 250, 330). L'ATP qui vient de l'oxydation phosphorylante est échangé avec de l'ADP par un enzyme hautement spécifique, situé au niveau de la membrane interne (VIGNAIS, 332 ; KLINGENBERG, 134). Il est ensuite déphosphorylé dans l'espace inter-membranaire pour réapparaitre de nouveau dans le cytosol grâce à l'action de deux phosphocréatine kinases dont l'une est mitochondriale (JACOBS, 119), l'autre cytosolique (YAGI, 364). Cet efflux des équivalents énergétiques mitochondriaux est bloqué par l'atractyloside (VIGNAIS,332) inhibiteur spécifique de la nucléotide translocase (KLINGENBERG, 137). Il l'est également par certains corps tout à fait physiologiques, tels que les dérivés acylés du coenzyme A (VIGNAIS, 211). L'inhibition de l'adényl translocase par l'oléyl-CoA et par l'oléate (WOJTZACK, 360) suggère le rôle important de certains intermédiaires métaboliques dans le contrôle de la production mitochondirale d'énergie par le biais de leur action sur la perméabilité de la membrane interne.

La dernière remarque tenant compte de ce qui vient d'être dit concerne les difficultés d'interpré-tat-on des résultats obtenus in vitro. Les mitochondires sont souvent isolées par des procédés drastiques (digestion trypsique du tissu). En outre, la composition des milieux d'incubation est peu comparable à celle du cytosol (SCHWARTZ, 314 ; Van KORFF, 144). Les modifications du transport transmembranaire d'adényl nucléotides secondaires aux conditions métaboliques particulières de la cellule, peuvent donc disparaitre après l'ultracentrifugation et la resuspension des mitochondries dans un milieu d'incubation (MEIJER, 188).

Il nous semble que dans ces conditions, il est difficile de faire un lien étroit entre les résultats obtenus in vitro et la capacité de fournir de l'ATP par les mêmes mitochondries in situ (Van KORFF,143).

- b) Transport transmembranaire des intermédiaires métaboliques et des effecteurs allostériques.

Arpès la description de l'adényl translocase, un certain nombre d'autres transférases spécifiques aux différents substrats du métabolisme intermédiaire a été localisé au niveau de la membrane mitochondriale. Certaines d'entre elles jouent sans aucun doute un rôle important dans l'intégration des diverses voies métaboliques intracellulaires (cf. MEIJER, 183 ; La NOUE, 139 ; KLINGENBERG, 134 ; PULLMAN, 260).

C'est grâce au malate/aspartate (La NOUE, 139) et α- glycerophosphate (KUBISTA, 156) shuttles que sont maintenues les conditions redox particulières du cytosol et de l'espace intramitochondrial. Les deux systèmes sont, semble-t-il, énergie dépendante (LEHNINGER, 166 ; La NOUE, 160), ce qui explique pourquoi, dans certaines conditions, le flux net des équivalents réducteurs est entrant (découplage de l'oxydation phosphorylante, hyperthyréose), dans d'autres cas sortant (néoglucogenèse) (cf. MEIJER, 183 ; WILLIAMSON, 354).

L'importance des mouvements transmembranaires du citrate dans le contrôle du flux glycolytique et dans l'intégration du métabolisme des glucides et des acides gras a été souvent discutée (RANDLE, 271 ; NEELY, 219 ; OPIE, 230). Le rôle du citrate comme effecteur allostérique de la phosphofructokinase (PFK) a d'ailleurs initié les recherches d'autres médiateurs analogues

impliqués dans le contrôle de la glycolyse (RANDLE, 271 ; NEWSHOLME, 222 ; NEELY, 219). Depuis lors, les effets allostériques de nombreux métabolites intracellulaires ont été établis au niveau de la PFK, de la phosphorylase et d'autres enzymes (NEWSHOLME, 222 ; KREBS, 150 ; RANDLE, 271).

Un autre système de transport transmembranaire ayant un rôle important dans le contrôle du métabolisme intermédiaire, a été décrit par BREMER (18 , 19) : la carnitine-fatty acid transférase nécessaire au transport des acides gras au travers de la membrane mitochondriale . Son implication dans le catabolisme des lipides est évidente (LEHNINGER, 168). Une signification nouvelle a été proposée par WHEREAT (342 ; cf. MEIJER, 183) qui a décrit en 1969 le "fatty acid cycle" dont le rôle serait le contrôle des mouvements transmembranaires des équivalents réductifs. Il serait donc analogue à l'αglycérophosphate et le malate/aspartate shuttles (cf. MEIJER, 183).

La plupart des translocases situées au niveau de la membrane mitochondriale a été plus ou moins définie, quant à la nature des groupements actifs et leur sensibilité aux divers inhibiteurs. Le rôle précis de chacune d'entre elles dans l'apparition des divers troubles métaboliques in vivo restent cependant mal compris. Cette situation pourrait changer dans un avenir proche, grâce au développement des techniques d'isolement des cellules cardiaques afin d'étudier leur comportement au cours des diverses conditions expérimentales. La technique des cellules isolées a déjà été appliquée à l'étude des interactions mitochondrio-cytosoliques des celluels hépatiques (MEIJER, 183 ; WILLIAMSON, 355 ; OHKAWA, cf. 183).

C. - CORRELATIONS ENTRE L'ULTRASTRUCTURE ET LA FONCTION DES MITOCHONDRIES

Dans de nombreux travaux concernant les fonctions des mitochondries isolées on a souvent constaté des changements du volume mitochondrial associés aux modifications de l'activité respiratoire (LEHNINGER, 167 ; PACKER, 237 ; GREEN, 89 ; BLAIR, 336). En dehors des modifications passives liées aux phénomènes osmotiques (BRIERLY, 116 ; GREENAWALT, 90) de nombreux auteurs ont pu démontrer une activité "mécanochimique" d'origine purement métabolique (HACKENBROCK, 95, 96 ; GREEN, 89, 99 ; LEHNINGER, 167 ; SCHWARTZ, 314). LEHNINGER (166) a décrit un oedème mitochondrial transitoire survenant au cours de l'oxydation du NADH exogène. Des résultats similaires ont été signalés par BLAIR (336), après l'addition de succinate. HACKENBROCK (95) et GREEN (99) ont montré que les changements de l'ultrastructure mitochondriale peuvent être également induits par l'addition d'ADP au cours de state 4- to - 3 transition.

1. Activité mécanochimique des mitochondries

Les études systématiques des relations entre la structure des mitochondries et leur état métabolique ont menées par PACKER (236, 238) et GREEN (89, 99) qui ont d'abord utilisés les techniques optiques (PACKER, 236) (light scattering), puis la microscopie électronique (GREEN, 99).

Ces études montrent que les variations du volume mitochondrial peuvent être expliquées essentiellement par des changements de l'ultrastructure de l'espace interne des mitochondries (GREEN, 89 ; BLAIR, 336). La membrane externe ne semble pas être impliquée dans ces phénomènes.

En 1966, le travail de l'équipe de GREEN (4, 94) a été repris par HACKENBROCK, qui a ajouté des mesures simultanées de la consommation d'oxygène et de fluorescence des coenzymes respiratoies (NADH). Il a examiné les 5 états respiratoires de CHANCE et WILLIAMS (36)et est arrivé aux conclusions suivantes :(Fig. 9)

Les mitochondries fraîchement isolées suspendues dans un tampon phosphate (état 1) montrent une structure "condensée". Leur matrice est dense, contenant de nombreux grains intracristam. La membrane interne est dissociée de la membrane externe et elle forme des invaginations multiples à l'intérieur de la matrice. Cette description correspond aux mitochondries "aggrégées" ou "non énergisées" de GREEN (89). La consommation d'oxygène de ces mitochondries est nulle (pas de substrat ni d'ADP exogène). Il y a 90 % de NADH réduit.

L'addition d'ADP (transition de l'état 1 à l'état 2) provoque une oxydation très importante du NADH et des autres coenzymes respiratoires (CHANCE, 38). La respiration reste cependant très faible, car cet état est "substrat limited" (CHANCE et WILLIAMS, 36). Au microscope électronique il y a toujours une prédominance très nette des formes "condensées".

Un apport d'un substrat exogène permet enfin des performances optimum de la chaine respiratoire exigeant la présence simultanée d'un excès de substrat, de phosphore inorganique, d'ADP et d'oxygène (état 3). Dans cette condition, la respiration est très rapide et le degré de réduction du NADH faible. L'énergie libérée par la chaine respiratoire est immédiatement utilisée pour la phosphorylation de l'ADP sans être stockée sous une forme quelconque par les mitochondries. Comme dans

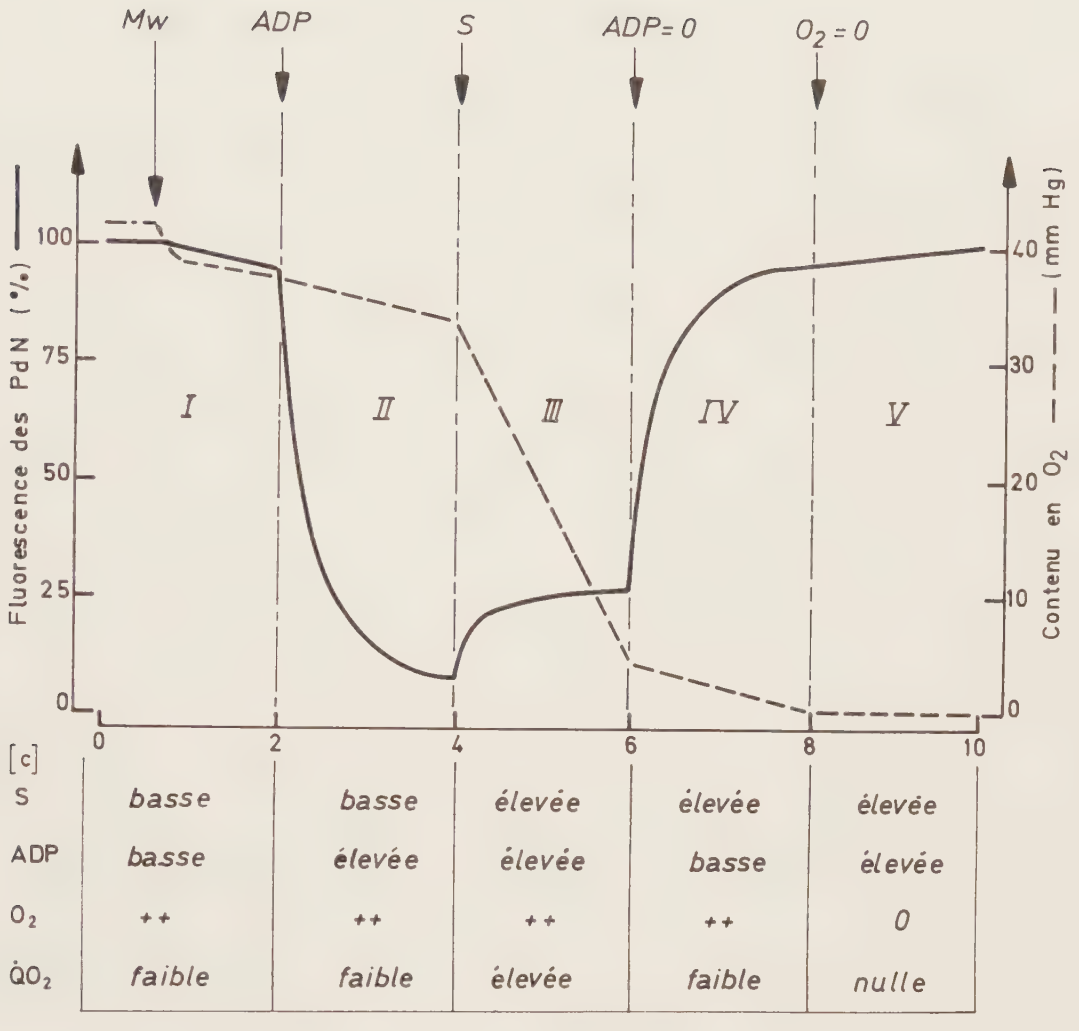


FIG. 9. CINQ ETATS RESPIRATOIRES DES MITOCHONDRIES ISOLEES : Multiples corrélations entre QO_2, degré de réduction du NADH, concentrations respectives du substrat, d'ATP et la pO_2 (selon B. CHANCE).

les conditions précédentes (état 1, 2) les mitochondries montrent dans la plupart des cas une structure "condensée", quelques mitochondries "orthodoxes" peuvent également apparaitre.

Mais ce n'est qu'au cours de l'état 4 (assez de substrat, de phosphore inorganique, d'oxygène, une grande partie de l'ADP déjà phosphorylée) qu'on voit une prédominance des mitochondries "orthodoxes" (HACKENBROCK, 95) ou "énergisées" (GREEN, 99). Leur ultrastructure ressemble beaucoup à celles qu'on trouve in situ après une bonne fixation : les deux membranes sont bien dessinées, l'espace intermembranaire étant réduit au minimum. Les crêtes sont bien régulières et la matrice peu dense. On ne voit que très peu de "corpus intracristam". La vitesse de la respiration est 5-10 fois plus faible qu'à l'état 3 et il y a 90 % de NADH réduit.

Une fois que tout l'oxygène est consommé, la respiration s'arrête complètement et la totalité des pyridine nucléotides est réduite (état 5 : substrat, ADP et Pi élevés, pO_2 nulle). L'aspect ultrastructural est de nouveau "condensé" ou "non-énergisé" comme il l'était au cours des états 1, 2 et 3.

Pour HACKENBROCK (95, 96) et GREEN (89, 99), l'incidence de deux aspects ultrastructuraux des mitochondries n'est pas due au hasard. Ces auteurs suggèrent que les changements réversibles de l'ultrastructure de la membrane interne représentent le mécanisme de captation et décharge de l'énergie libérée par la chaine respiratoire. L'intermédiaire hypothétique de l'oxydation phosphorylante ($X \sim I$) serait remplacé par des changements

de conformation de la membrane, visibles au microscope électronique:"energized state". La conformation riche en énergie serait celle de l'état 4 (mitochondries "orthodoxes" ou "énergisés") caractérisé par une respiration intacte et l'absence d'accepteur de phosphore inorganique. L'énergie stockée par la membrane interne serait utilisée pour phosphoryler l'ADP au cours de la transition de l'état 4 à l'état 3. Elle serait nulle dans les conditions de l'état 1 et 2, car la respiration est freinée par manque de substrat. Lors de ces trois conditions les mitochondries montrent un aspect "condensé" "non énergisé".

La théorie mécanochimique de l'oxydation phosphorylante de GREEN (4, 89, 99) et HACKENBROCK (95, 96) a suscité beaucoup d'intérêt. La recherche de $X \sim I$ (SLATER, 306) semblait enfin aboutir à un résultat positif et palpable. Les changements de la conformation des différents constituants de la membrane mitochondriale liés aux transitions métaboliques et suggérés également par de nombreux auteurs utilisant des techniques biophysiques (BOYER, 14 ; CHANCE, 70 ; WILLSON, 356, 357 ; PACKER, 236 ; KOLTOVER, 141) ont pris une signification nouvelle.

La corrélation entre l'ultrastructure et l'état fonctionnel des mitochondries isolées a été examinée dans d'autres laboratoires (WEBER, 336 ; STONER, 319 bis), avec des résultats similaires à ceux de HACKENBROCK, bien que leurs interprétations soient différentes. Il y a toutefois très peu de travaux systématiques concernant l'existence d'une activité mécanochimique des mitochondries <u>in situ</u> (POCHE, 254 ; WEINBACH, 338 ; HACKENBROCK,95). Nous avons repris ce sujet au cours de notre travail sur

les fonctions des mitochondries cardiaques, pour mieux comprendre la signification des aspects ultrastructuraux des mitochondries rencontrées au cours des diverses conditions expérimentales.

D. - REVUE DES TECHNIQUES ACTUELLES UTILISEES A L'ETUDE DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES

Quels sont les moyens techniques sur lesquels s'appuie notre compréhension des fonctions mitochondriales que nous venons de décrire. Dans quelle mesure des données sont-elles fiables. Nous allons essayer d'y répondre dans ce chapitre.

1. Technique d'étude des mitochondries isolées par ultracentrifugation (LEHNINGER, 166 ; DE DUVE,67).

Cette technique a fait avancer les recherches sur les mécanismes de l'oxydation phosphorylante (SLATER, 305 ; BOYER, 14 ; MITCHELL, 192) la stoichiométrie des transports ioniques (DRAHOTA, 66 ; ROSSI, 282 ; PRESSMAN, 54) et l'activité mécanochimique des membranes mitochondriales (GREEN, 87, 88 ; HACKENBROCK, 95, 96 ; BLAIR, 336). La fragmentation des mitochondries par des chocs osmotiques (BRIERLEY, 116 ; CHANCE, 42), par la digitonine (LOW, cf. 260 ; VIGNAIS, 332) ou par des ultrasons (LEE et ERNSTER, 164) a permis de décrire la composition chimique de la membrane interne (CHANCE, 40 ; LEHNINGER 166, 167), celle de la matrice (GREEN, 88 ; WOJTCZAK, 360) et de la membrane externe (LEVY, 172). Les systèmes enzymatiques du cycle de KREBS, de la chaine respiratoire ont été localisés (LEHNINGER, 166).

L'introduction des techniques permettant une extraction acide des culots des mitochondries (cf. KLINGENBERG,136) a permis d'étudier la cinétique du transport des divers substrats du métabolisme mitochondrial et la répartition des nucléotides de l'adénine entre les mitochondries et le milieu d'incubation (KLINGENBERG, 136 ; SLATER, 306). Les mécanismes concernant le contrôle de la respiration et les critères de l'état fonctionnel des mitochondries ont été établis grâce à cette technique. La consommation d'oxygène en absence d'ADP (QO_2 - état 4) est en général très faible. Son augmentation témoigne d'un découplage partiel de l'oxydation phosphorylante (CHANCE et WILLIAMS, 36). Celui-ci est également suggéré par une diminution du rapport P/O qui est à l'état normal proche de 3,0 pour les substrats NAD-dépendants, proche de 2,0 en présence du succinate et des substrats FAD dépendants (LEHNINGER, 166). La consommation d'oxygène augmente habituellement après addition d'ADP (QO_2 - état 3). Le rapport entre les QO_2 de l'état 3 et de l'état 4 est considéré comme l'index du contrôle respiratoire (ICR) exercé au niveau de la chaine respiratoire par les nucléotides de l'adénine (ATP et ADP) (CHANCE, 36, 38 ; KLINGENBERG, 135). Cet index varie à l'état normal entre 5-10, selon les conditions expérimentales données ; toute diminution témoigne d'un découplage et de la perte de l'intégrité structurale des mitochondries (CHANCE, 36 ; LEHNINGER,166). Un autre critère, souvent étudié est l'activité ATPasique des mitochondries (LEHNINGER, 166 ; MITCHELL, 192). Elle doit être à l'état normal très basse, son augmentation n'apparait que sous l'influence du dinitrophénol (LEHNINGER, cf. 166) et en présence des ions bivalents (CHANCE, 34 ; ROSSI, 284 ; LEHNINGER, 169), conditions défavorables pour la conservation d'énergie du

substrat sous une forme utilisable. Elle est inhibée par l'oligomycine (LEHNINGER, 166) et d'autres inhibiteurs de l'oxydation phosphorylante (PULLMAN,260).

De nombreuses tentatives ont été faites pour mesurer tous ces index sur les culots de mitochondries isolées afin d'expliquer les mécanismes immédiats des diverses conditions pathologiques (29, 112, 144, 173).

Une diminution du contrôle respiratoire a été signalée dans les mitochondries des coeurs ischémiques (JENNINGS, 121) et hypoxiques (REYNAFARJE, 277), leur rapport P/O reste normal (REYNAFARJE,277) ou est diminué (HERDSON, 112).

Un découplage a été décrit par certains auteurs au niveau des mitochondries cardiaques des animaux traités par la thyroxine (MICHEL, 190) et par les catécholamines (SOBEL, 310). SCHWARTZ et WOLLENBERGER l'ont trouvé également sur les mitochondries des coeurs insuffisants (173, 363). Ces résultats contrastent avec ceux de POOL et SPAN (311) qui ne trouvent pas dans les mêmes conditions la moindre modification du rendement de l'oxydation phosphorylante.

Toutes ces contradictions ne sont peut être pas surprenantes. Il y a d'abord des raisons techniques : l'état fonctionnel des mitochondries isolées dépend énormément des conditions expérimentales (SCHWARTZ,315 ; Van KORFF, 143). La composition du milieu d'incubation (LINDENMAYER, 225) ainsi que la technique d'isolement des mitochondries (SCHWARTZ, 315) déterminent en effet leur corportement in vitro. On peut alors difficilement comparer les résultats des travaux des

différents auteurs n'utilisant pas les mêmes conditions expérimentales (Van KORFF, (143).

Mais, même si les techniques employées étaient strictement standardisées, il reste un doute concernant le rapport existant entre le comportement des mitochondries isolées et leur état métabolique in vivo (Van KORFF, 143 ; SAFER, 289). Il n'est pas certain que les résultats obtenus in vitro reflètent fidèlement l'activité métabolique des organes intacts. Les mitochondries sont en effet des systèmes ouverts par excellence. De ce fait elles sont soumises à un contrôle exercé par le milieu ambiant (Van KORFF, 143 ; VIGNAIS, 211 ; WOJTCZAK, 360). On peut facilement concevoir qu'un trouble de l'homéostasie cellulaire (hypoxie, troubles ioniques, acidose, etc.) entraine une anomalie du métabolisme mitochondrial in situ, et que celle-ci va disparaitre une fois les mitochondries suspendues dans un milieu d'incubation dont la composition est strictement identique pour les mitochondries des témoins et celles des coeurs pathologiques.

La complexité des interactions mitochondriales cytosoliques, telles qu'elles existent in vivo explique le besoin d'utiliser les moyens techniques permettant de suivre les fonctions mitochondriales in situ, dans les organes intacts. Ce n'est qu'en employant de telles techniques que nous allons comprendre un jour le mécanisme des divers états pathologiques dans lesquels existe un déficit énergétique.

2. Moyens d'étude des fonctions mitochondriales in situ.

- a) Mesures de la consommation d'oxygène.

Le contrôle in situ de l'état fonctionnel des

mitochondries se base le plus souvent sur les calculs de la consommation d'oxygène par le myocarde (MVO_2). Celle-ci est égale au produit du débit coronarien (DC) par la différence artérioveineuse du contenu en oxygène ($O_2a - O_2sc$).

$$MVO_2\left[\text{mmoles/gdw/min}\right] = DC\left[\text{ml/gdw/min}\right] \times (O_2a - O_2sc)\left[\text{mmoles/ml}\right]$$

Dans les conditions actuelles de mesure, les valeurs obtenues ne sont que des moyennes sur un certain temps et pour un poids donné de ventricule (1 min, 1 g respectivement). Elles ne rendent pas compte des variations de la consommation d'oxygène au corus du cycle contractile et en différents points du coeur. En effet, la consommation d'oxygène du ventricule gauche semble être beaucoup plus importante que celle du ventricule droit ou des oreillettes (cf. 101, 131). Une relation étroite entre les performances mécaniques et la consommation d'oxygène a été démontrée in situ (CLANCY, 52 ; BRAUNWALD, 313) et in vitro (OPIE, 229 ; NEELY,219). Si la consommation d'oxygène d'un coeur arrêté est d'environ 2,5 ml/min/100 g, celle d'un coeur battant est de 8-16 ml/min/100 g (cf. HATT, 101 ; CHALLONER, 30 ; KLOCKE, 138). Elle augmente encore au cours d'un effort et sous l'effet des drogues inotrope-positives (SONNENBLICK, 313 ; CRONIN, 61 ; COVELL, 312).

Des tentatives ont été faites pour calculer le rendement énergétique du travail systolique en mettant ce dernier en rapport avec l'équivalent énergétique de l'oxygène consomme :

$$Rt\left[\%\right] = Wext\left[\text{ergs}\right] / MVO_2\left[\text{ergs}\right]$$ (cf. HATT, 101)

Ce rendement est déjà à l'état normal relativement bas (15 % environ) (cf. HATT, 101) :

Wext = P(mmHg) x D.S. (ml) = 100 x 80 x 1,333 = 1,06 Joules

Energie consommée en O_2 = 7 Joules

(Equivalent énergétique d'1ml O_2 = 2,06 Kgm soit 20 Joules)

Il diminue encore dans divers états pathologiques (RUSHMER, 286) et au cours de certaines épreuves pharmacodynamiques (SONNENBLICK, 312). Cette diminution du rendement mécanique a été souvent interprétée comme témoin des troubles de la fabrication d'énergie par les mitochondries (découplage de l'oxydation phosphorylante), ce qui n'est qu'une affirmation prématurée, car l'interprétation des travaux concernant le rendement mécanique du travail cardiaque se heurte à l'heure actuelle à deux difficultés :

- le coût énergétique du travail externe varie sensiblement avec la vitesse de la contraction et avec les fluctuations du travail interne, que nous ne savons pas mesurer avec précision (cf. HATT, 101 ; BRITMAN,20). Cette défaillance peut expliquer un certain nombre de données paradoxales concernant une "amélioration" du rendement au cours d'un exercice (LEVINE, 171 ; HATT,101 ; LOMBARDO, 175) et en altitude (MORET, 212) : pour des performances ventriculaires identiques, le rendement du travail cardiaque est en général "meilleur" au cours d'une surcharge de volume qu'au cours d'une surcharge de pression (COLEMAN, 55, 56 ; GUNNING, 57). L'effet de "gaspillage d'oxygène" observé après l'administration des catécholamines (RAAB, cf. 6) ou d'acides gras (CHALLONER, 29) pourrait également être lié à des modifications du travail interne et surtout à celles de la vitesse du raccourcissement (SONNENBLICK, 312).

- Dans certaines conditions expérimentales (coeur isolé, coeur-poumon), la consommation d'oxygène calculée

à partir de la différence artérioveineuse en O_2 et du débit coronaire reflète la somme de la quantité d'oxygène réellement consommé par le myocarde et de celui échangé avec le milieu ambiant (FOLLERT, 78). Selon LÜBBERS (182) cette dernière est non négligeable, quand des milieux suroxygénés sont utilisés pour la perfusion (la pO_2 du KREBS HENSELEIT habituellement employé est de l'ordre de 600 mmHg, celle de l'air ambiant de 150 mmHg seulement). La fraction d'oxygène perdue par la diffusion est difficile à déterminer car elle varie sensiblement avec la distribution du flux coronaire. Les valeurs de la consommation d'oxygène sont alors sujettes à caution.

- b) La production du CO_2 marqué à partir des divers substrats exogènes a été souvent appliquée à l'étude de la respiration et à celle du cycle de KREBS du myocarde (NEELY, 219 ; CRASS, 60 ; OPIE, 230). L'analyse de la distribution du ^{14}C dans les divers pools métaboliques a permis d'établir le rôle des mitochondries dans la glycogenèse (RANDLE, 271 ; KREBS, 149), la synthèse des triglycérides (CRASS, 60 ; REGAN, cf. 230) et le métabolisme des acides aminés (SAFER, 282 ; LOWENSTEIN, 178).

Il faut rappeler cependant, que la production du $^{14}CO_2$ ne reflète l'activité du cycle de KREBS que de façon semi-quantitative, surtout si elle est mesurée in vivo (BING, cf. 101 ; GUDBJARNASON, 93), où l'on peut difficilement standardiser les conditions métaboliques. L'oxydation du substrat marqué peut être modifiée par la dégradation des réserves intracellulaires et l'utilisation des autres substrats sanguins (RANDLE, 279). L'existence d'un certain nombre d'oxydations non phospho-

rylantes (BRACHFELD, 16), la mise en réserve du substrat marqué ainsi que la possibilité d'un simple échange du marqueur, perturbent également les résultats. Un autre désavantage de cette technique est le suivant : elle ne permet pas de suivre les transitions respiratoires rapides (variations de la respiration au cours d'un seul cycle cardiaque, par exemple - CHANCE, 45), car la production du $^{14}CO_2$ doit être intégrée pendant un temps relativement long (OPIE, 230 ; NEELY, 219). Seuls les états stationnaires peuvent être étudiés par cette technique.

- c) Dosages des métabolites du cycle de KREBS Dans les extraits tissulaires

Les variations des flux métaboliques instantanés dans diverses portions du cycle de KREBS ont été calculées à partir des taux tissulaires des substrats du cycle de KREBS (WILLIAMSON, 289 ; RANDLE, 271 ; NEELY, 219). Il ne s'agit cependant que d'une appréciation peu précise de l'activité métabolique mitochondriale, car les concentrations tissulaires sont en effe très différentes de celles qui existent dans le compartiment mitochondrial (KREBS, 153 ; WILLIAMSON, 353). Les taux cardiaques de certains substrats clef (oxaloacétate, cetoglytarate, acetyl-CoA) sont en plus extrêmement faibles. La moindre erreur analytique peut donc fausser considérablement les calculs des flux métaboliques (LOWENSTEIN, 177). Il s'en suit que toute interprétation de ces résultats doit être faite avec beaucoup de précaution. Les analyses chimiques devraient être accompagnées par l'emploi d'une autre technique plus spécifique pour être sûr du résultat.

- d) Mesures de la pO_2 intracellulaire

De nombreuses tentatives ont été faites pour étudier la respiration à partir des mesures de la pO_2 intracellulaire (SCHUCHARDT, 294, 295 ; LÜBBERS, 182 ; WHALEN, 341). Tout en laissant de côté les difficultés techniques (taille des électrodes, hétérogénéité de la pO_2 intracellulaire, etc.), il est évident que les variations de la pO_2 intracellulaire ne reflètent pas uniquement les fluctuations respiratoires. Elles dépendent également des variations du débit coronaire et du transport d'O_2 dans le tissu (LÜBBERS, 182 ; GRÜNEWALD, 91). Les mesures électrochimiques de la pO_2 intracellulaire ne permettent pas d'étudier les fluctuations de l'activité mitochondriale in situ ; elles ne sont qu'un test utile permettant d'apprécier l'état de l'oxygénation du myocarde (GRÜNEWALD, 91 ; SCHUCHHARDT, 294).

La pO_2 intracellulaire et ses variations peuvent également être contrôlées indirectement. Il y a d'abord les mesures optiques de l'émission fluorescente de l'acide pyrenbutyrique (APB) qui une fois excité à 320-340, devient fluorescent à 375-395 nm (JÖBSIS, 125) ; à un taux intracellulaire donné, l'intensité de la fluorescence des APB est indirectement proportionnelle à la quantité tissulaire de l'oxygène, car ce dernier possède un "quenching effect" très puissant vis à vis de cette émission fluorescente. Cette technique n'a pas été utilisée souvent en physiologie cardiaque, mais les premiers résultats de JÖBSIS (126) suggèrent que l'APB pourrait être utilisé pour étudier semi-quantitativement l'état d'oxygénation du myocarde et ses fluctuations.

Une autre technique permettant d'étudier la pO_2 intracellulaire est celle de COBURN (53). Cet auteur dose chimiquement le degré de saturation de la myoglobine du myocarde et, en connaissant sa courbe de dissociation, il calcule la pO_2 intracellulaire instantanée. La technique peut être appliquée uniquement aux organes perfusés avec du sang, car la connaissance de la pO_2 artérielle et du degré de la saturation de l'Hb est indispensable pour les calculs du degré d'oxygénation des cellules musculaires (COBURN, 53).

- e) Les mesures optiques du degré de réduction des coenzymes respiratoires sont le seul moyen actuel permettant à la fois un contrôle direct de la chaîne respiratoire et l'étude de la cinétique des transitions respiratoires rapides (CHANCE, 44 ; LÜBBERS, 73, 180 ; JÖBSIS, 123, 124). Il y a actuellement deux accès méthodologiques : (1) mesures de l'émission fluorescente du NADH et de celle du FAD (THORELL, 140 ; CHANCE, 35, 37 ; STAISBY, 125), (2) enregistrement des spectres d'absorption des cytochromes (CHANCE, 43 ; LÜBBERS, 179 ; YONETANI, 366). Les deux techniques ont été souvent employées les les biochimistes étudiant la respiration des mitochondries isolées (CHANCE, 36 ; LÜBBERS, 179 ; ERECINSKA, 70, 46 ; WILSON, 356).

Leur principe est le suivant : il y a le long de la chaine respiratoire un gradient de réduction (CHANCE et WILLIAMS, 36). Si au repos (état 4) le NADH (côté substrat) est quasi réduit, le cytochrome a_3 (côté oxygène) est presque totalement oxydé (CHANCE et WILLIAMS, 36). Quand la respiration s'accélère (état 3), le degré de réduction de tous les coenzymes diminue.

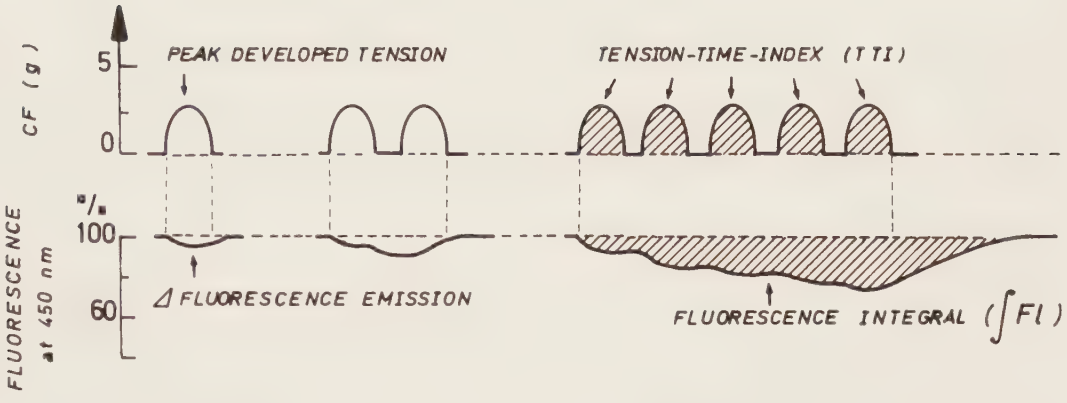
Quand elle se ralentit la chaine respiratoire devient de plus en plus réduite ; elle l'est complètement après un arrêt respiratoire anoxique (état 5) (Fig. 7).

Le rapport entre le potentiel redox de la chaine respiratoire et la vitesse de la respiration a été également retrouvé sur les cellules entières (CHANCE, 37, 45 ; JÖBSIS, 122, 123) grâce au développement des appareils à double longueur d'onde (GRAHAM, 43 ; JÖBSIS, 124).

C'est également avec cet équipement, que les études spectroscopiques et fluorimétriques de la respiration des organes intacts sont devenues possibles (CHANCE, 45 ; LÜBBERS, 122, 180 ; JÖBSIS, 73, 123. Les artefacts liés au déplacement de la préparation au cours de la mesure (contraction musculaire, perfusion pulsatile) peuvent être éliminés par une lecture différentielle de deux émissions lumineuses, dont l'une sert comme référence (λ_R) Dans les études fluorimétriques, on utilise comme λ_R la longueur d'onde de faisceau primaire (JÖBSIS, 123, 125; O'CONNOR, 124) ; en spectrométrie le λ_R correspond à un des points isosbestiques compris dans le domaine spectral étudié (CHANCE, 43 ; LÜBBERS, 179).

L'application de telles techniques à l'étude quantitative du rendement énergétique de la contraction musculaire et cardiaque a été proposée par JÖBSIS (125). Sous réserve d'un trouble de l'oxydation phosphorylante (actuellement difficilement contrôlable) des modifications du coût énergétique du travail cardiaque ont été signalées après administration de certaines drogues cardio-actives (MILLS, 189) (Fig. 10).

Il ne parait pas irréaliste de croire que l'emploi des techniques optiques quantitatives aidera un jous à comparer les ressources énergétiques dont disposent le muscle cardiaque normal et insuffisant.



$$\text{RENDEMENT (p.c.)} = \frac{\text{TENSION-TIME-INDEX (ergs)}}{\int \text{FL (équivalents énergétiques)}}$$

FIG. 10. ENREGISTREMENT SIMULTANE DE L'ACTIVITE MECANIQUE ET DES PHENOMENES METABOLIQUES. ETUDE DU RENDEMENT ENERGETIQUE DU TRAVAIL CARDIAQUE (selon F.F. JOBSIS).

II. CONTRIBUTION PERSONNELLE

A. - MATERIEL ET TECHNIQUES EMPLOYES

Plusieurs abords méthodologiques ont été employés au cours de ce travail, dont le but principal a été la recherche des techniques adéquates permettant d'apprécier l'activité métabolique des mitochondries cardiaques *in situ*.

1. Animaux

La grande majorité des expériences a été réalisée sur des rats (Wistar, mâles, 250-350 g) ; dans quelques expériences seulement nous avons employé des lapins (Fauves de Bourgogne, mâles, 2 kg). La plupart des animaux ont été élevé dans l'animalerie du laboratoire (INSERM, Hôpital Léon Bernard), exception faite pour les rats élevés dans les animaleries de la Johnson Foundation, Philadelphie et de la Royal Postgraduate School of Medicine, London. Le traitement particulier des animaux, s'il y en avait un, sera décrit avec chaque protocole expérimental réalisé.

2. Perfusion des coeurs isolés

Deux types de perfusion ont été utilisés : (1) perfusion aortique rétrograde de type LANGENDORFF (157) et (2) perfusion par l'oreillette gauche avec une éjection systolique conservée, technique de NEELY, (216). Les coeurs de lapins, perfusés selon LANGENDORFF, ont été maintenus en contraction isovolémique à l'aide d'un ballonnet rem-

pli d'eau et introduit par l'oreillette gauche dans la cavité ventriculaire (SWYNGHEDAUW, 322), permettant ainsi un contrôle continu des performances ventriculaires.

Les animaux précédemment héparinés (10 mg/kg) ont été sacrifiés sans aucune anesthésie par fracture de la colonne vertébrale. Les coeurs ont été rapidement extirpés et immédiatement immergés dans un Ringer froid, contenant 10 mg d'héparine par litre. Ensuite l'aorte a été fixée sur une canule métallique (2 mm de diamètre extérieur pour le rat, 3,5 mm environ pour les coeurs de lapin), raccordée au circuit de perfusion. Le délai entre l'arrêt de la circulation et le début de la perfusion aortique n'a jamais excédé 60 sec. Dans ces conditions, le coeur perfusé reprend rapidement un rythme élevé (supérieur à 200 bpm) qui reste en général stable pendant au moins 30 minutes. Au-delà de ce temps nous avons souvent observé une diminution progressive du débit coronaire accompagnée d'une détérioration simultanée des performances cardiaques. C'est pourquoi, dans la plupart des cas, nous n'avons pas excédé ce temps critique. Sur les coeurs perfusés selon NEELY une deuxième canule a été introduite par une des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche, pour ensuite permettre une perfusion physiologique des cavités ventriculaires et une éjection aortique.

Comme liquide de perfusion nous avons utilisé en général le tampon de KREBS et HENSELEIT (148), contenant 20 mmoles de bicarbonate, équilibré à 37°C avec 95% d'O_2 et 5 % de CO_2, à un pH final de 7,4, à une pO_2 entre 580 - 620 selon les fluctuations de la pression atmosphérique. Les concentrations des autres électrolytes sont les suivantes : NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, $NaHCO_3$ 20 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, KH_2PO_4 1,2 mM.

Le substrat le plus souvent utilisé était le glucose 5 - 10 mmolaire. Le choix des autres substrats, tels que le d-β-OH-butyrate, glucose + acétate, pyruvate, a été parfois nécessaire, surtout dans les expériences portant sur l'activité métabolique du myocarde.

3. Contrôle des performances mécaniques

- a) Préparation de LANGENDORFF

Les performances mécaniques des coeurs "non travaillant" sont déterminées uniquement par le développement de la pression intraventriculaire. L'éjection aortique est en général peu importante, faute d'un mauvais remplissage ventriculaire. Parmi les facteurs déterminant le degré de pression développé, la pression de remplissage des coronaires occupe une place très importante. Nous avons essayé toute une gamme de pression de perfusion pour obtenir les fluctuations des performances mécaniques du ventricule gauche. Comme index de contractilité nous avons pris le produit de la pression intraventriculaire par la fréquence cardiaque. La pression ventriculaire a été mesurée à l'aide d'une aiguille (diamètre 20 G) traversant la paroi ventriculaire et connectée à un capteur de pression (Millar Mikro-Tip transducer 5F-PC 350 ou Thomson-Telco RA 93 transducer). La courbe de pression, ainsi que le dp/dt ont été enregistrés toutes les 5 minutes sur un enregistreur rapide (Gould 440 ou Thomson-Telco ED 26 recorders).

- b) Coeur travaillant (NEELY, 216, 217).

Les conditions hémodynamiques des coeurs perfusés par l'oreillette gauche ont été les suivantes : pression de remplissage de l'oreillette gauche, 13,6 cm H_2O,

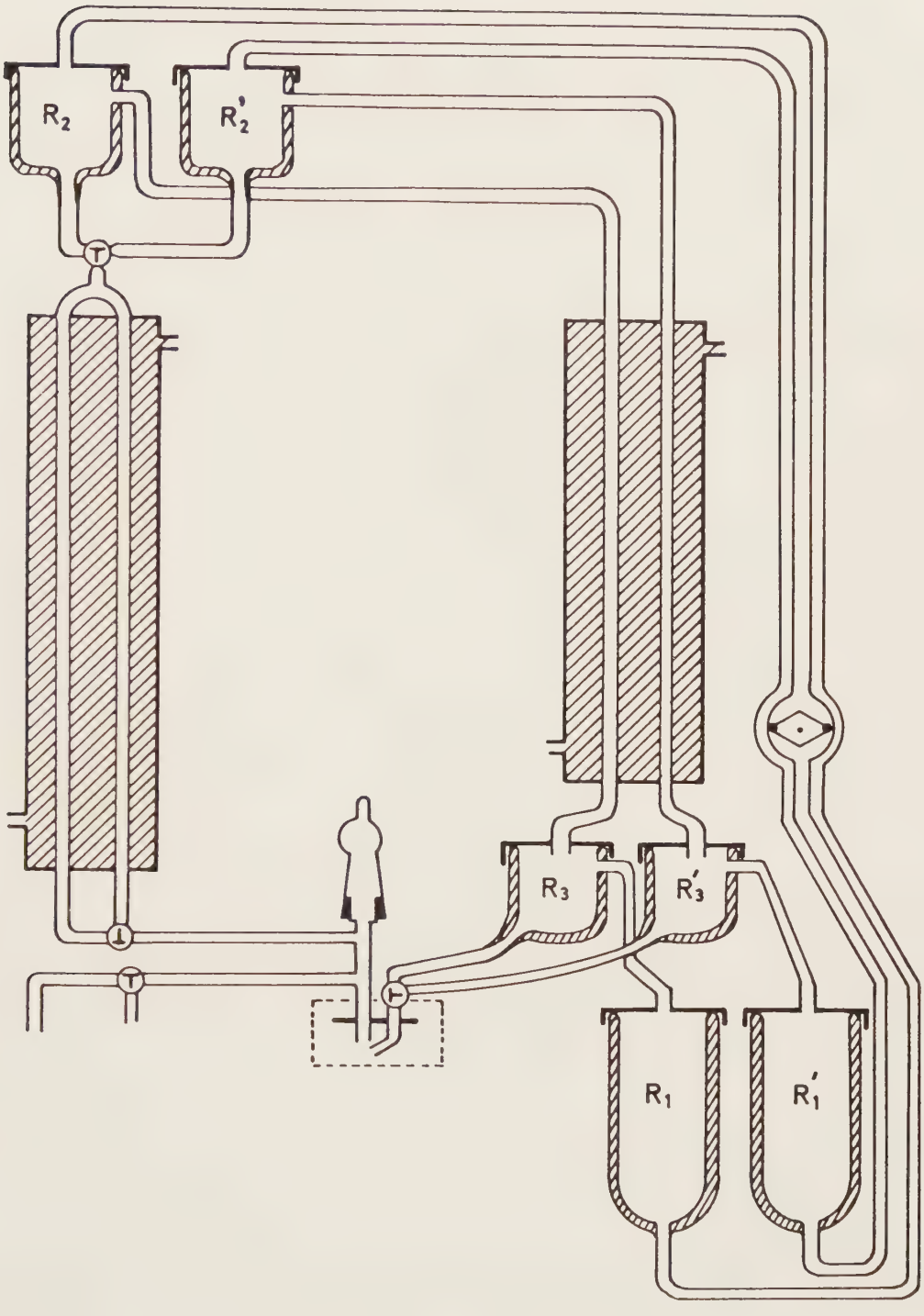


FIG. 11. SCHEMA DE L'APPAREIL DE PERFUSION DU COEUR TRAVAILLANT (préparation de J.R. NEELY).
R_1, R_2, R_3 - réservoirs à double parois.

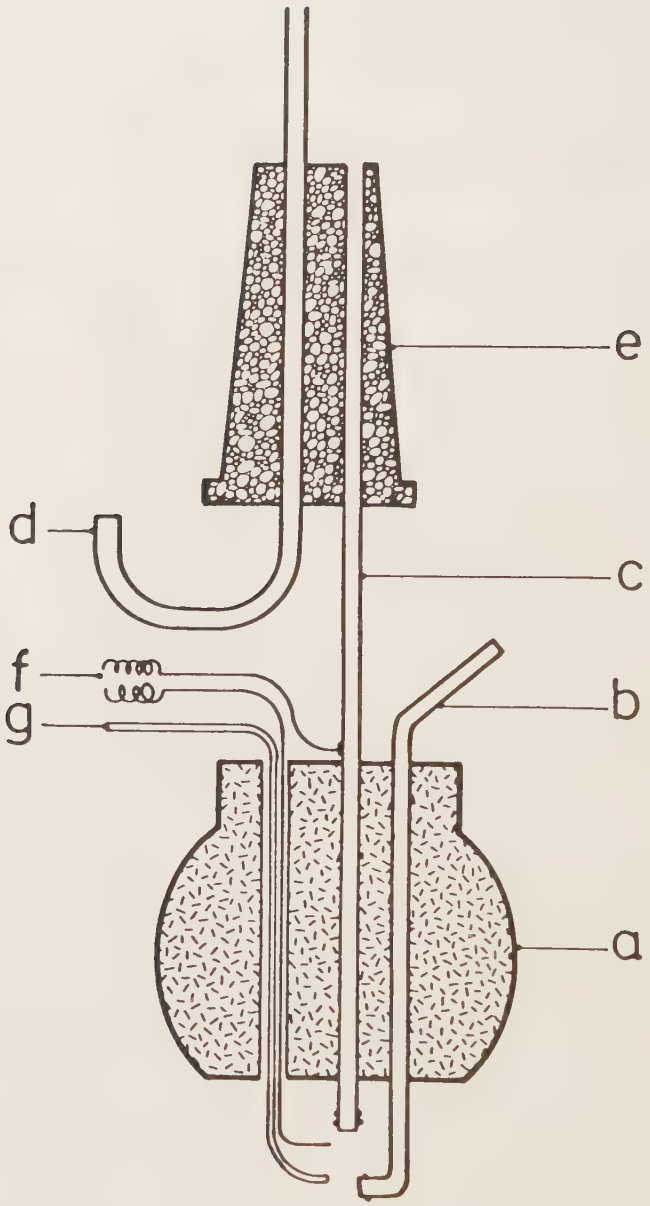


FIG. 12. DETAIL DU MONTAGE DES CANNULES DE PERFUSION (selon J.R. NEELY).

a - bloc de teflon, b - cannule auriculaire, c - cannule aortique, d - colonne aortique, e - bouchon en teflon, f - électrodes de stimulation, g - capteur de pression.

résistance aortique à l'éjection systolique 60 mmHg, fréquence cardiaque 300 bpm. Le système est composé de deux circuits parallèles permettant de changer rapidement le liquide de perfusion (Fig. 11 et 12).

Les variations de la pression intraventriculaire et sa dérivée première ont été mesurées avec le même équipement que dans le groupe précédent. Le débit aortique a été contrôlé par un rotameter (Manostat 36-541-12 flowmeter) faisant partie du circuit de perfusion. Le débit coronaire a été mesuré avec une éprouvette à la sortie de l'artère pulmonaire. Cette technique rudimentaire s'est montrée beaucoup plus efficace que l'emploi d'un débitmètre électromagnétique (Telco-CME-flowmeter). Ce dernier nécessite une canulation de l'artère pulmonaire, qui, selon notre expérience, perturbe régulièrement le flux coronaire et les performances ventriculaires.

Dans certaines expériences la pO_2 artérielle a été enregistrée en continu avec le matériel Radiometer-Copenhagen (pH-Meter 27 équipé d'une unité pour analyse des gaz du sang 62-11-01). La pO_2 veineuse a été mesurée toutes les 5 - 10 minutes avec le même appareil dans les échantillons du liquide de perfusion recueillis à la sortie de l'artère pulmonaire dans les tubes héparinés du Mikrosampling Kit Unit E 5021a. Là, non plus, nous n'avons pas canulé l'artère pulmonaire, ce qui aurait permis de suivre la pO_2 veineuse en continu, pour éviter les troubles contractiles secondaires à une telle manipulation.

A partir de ces données, on peut calculer la consommation d'oxygène :

$$MVO_2 \left[/^{umole/g/min} \right] = \frac{(paO_2 - pvO_2) \times \text{débit coronaire} \times \text{coef. } 37°C}{760 \times \text{poids sec} \times 22,4}$$

et le travail cardiaque :

$$W \left[kgm/g/min \right] = \frac{(\text{débit aortique} + \text{débit coronaire}) \times \text{pression}}{\text{poids sec}}$$

4. Contrôle de l'état métabolique au cours de la perfusion

L'activité métabolique du coeur perfusé, en particulier celle de la chaine respiratoire, a été contrôlée au cours de la perfusion par les mesures de la MVO_2 et celles du potentiel redox intracellulaire. Les fluctuations de ce dernier ont été suivies - soit indirectement par les dosages du lactate et du pyruvate dans le liquide de perfusion (OPIE, 232 ; SCHEUER, 291, 292) - soit directement par les techniques optiques (CHANCE, 45 ; JÖBSIS, 122, 123 ; LÜBBERS, 73, 181).

Le liquide de perfusion a été relevé pendant des intervalles de 15 ou 30 secondes dans des tubes gradués contenant un volume connu d'acide perchlorique 0,3M. Après neutralisation le surnageant a été immédiatement analysé pour le pyruvate ou le lactate. Le rapport lactate/pyruvate a été calculé à partir de ces données (travail réalisé en collaboration avec Miss. P. OWEN et Prof. L.H. OPIE).

Le contrôle direct des fluctuations du potentiel redox de la chaine respiratoire (permettant d'apprécier semi-quantitativement la cinétique des transitions métaboliques in situ) a été fait par deux moyens qui sont les suivants :

- a) Etude du degré de réduction des pyridine-nucléotides totaux par fluorimétrie épicardique.

La technique de CHANCE (45) et JÖBSIS (124) a été utilisée pour mesurer l'émission fluorescente du NADH et du NADPH tissulaires sur la surface du coeur perfusé selon LANGENDORFF. Le coeur a été placé sous l'objectif (Leitz-APO 12,5/0,30) d'un épi-illuminateur (Leitz Metal-Opak), faisant partie du cytophotomètre Leitz-MPV-1. A l'aide d'un crochet métallique (0,25 mm), permettant d'étirer la préparation, le ventricule gauche a été à peu près immobilisé. La surface ventriculaire, humidifiée par l'éfluent de la veine pulmonaire, peut être couverte hermétiquement par une lamelle microscopique pour éviter les échanges gazeux entre le tissu et l'air ambiant. Les répercussions d'un tel traitement sur la microcirculation locale sont moindres (LÜBBERS, 181).

Placé à 5 mm de distance, le coeur est ensuite excité par un faisceau primaire dont la longueur d'onde (365 ± 12 mm) est sélectionnée à l'aide d'un filtre interférentiel de Grubb-Parsons (type 2). Une lampe à vapeurs de Hg (initialement HBO 200, plus tard HBO 100) a été utilisée comme source de lumière d'excitation. La plus faible puissance nominale de la HBO 100 (100 W contre 200 W de la HBO 200) est largement compensée par sa plus grande luminosité et surtout par la stabilité de son émission lumineuse (alignement en continu).

Le maximum de fluorescence du NADH se situe entre 460 - 480 nm. Pour la mesurer nous avons initialement utilisé comme filtre secondaire interférentiel de

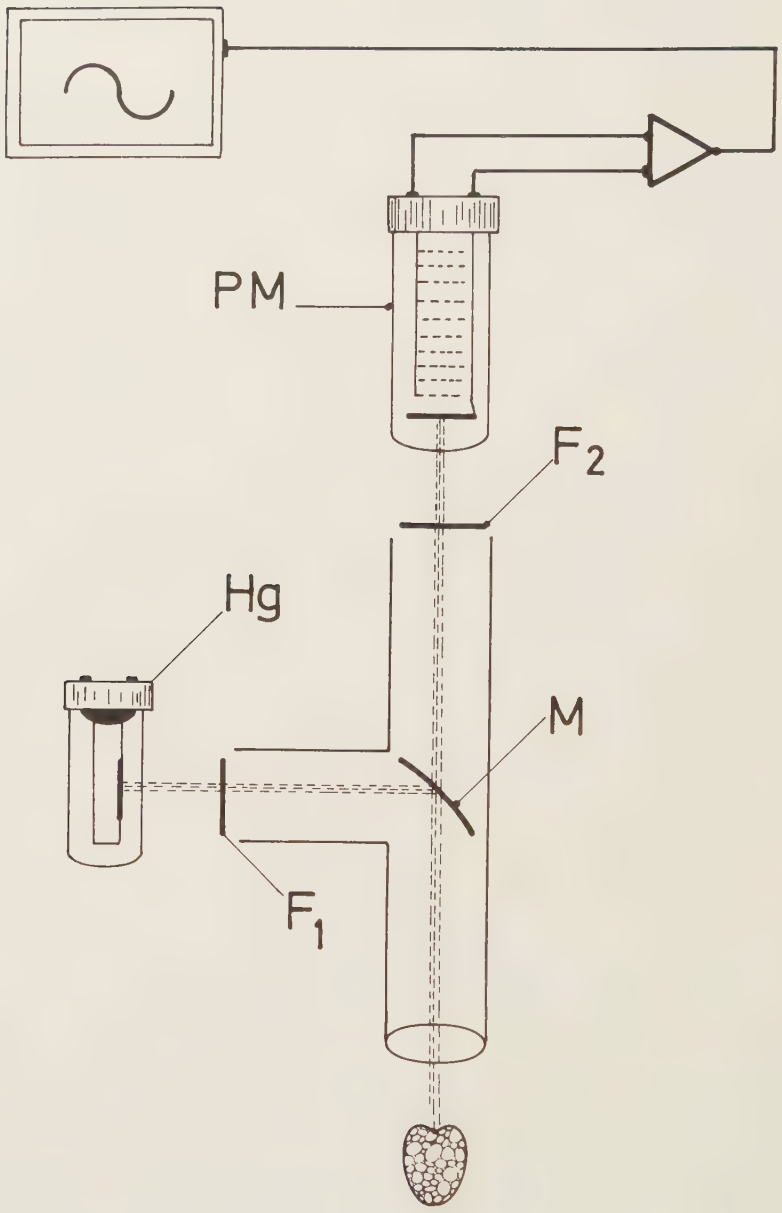


FIG. 13. SCHEMA DU FLUORIMETRE EPICARDIQUE

Hg - lampe à mercure HBO 100, F_1 - filtre primaire, F_2 - filtre secondaire et filtre d'arrêt, m - miroir dichroique , PM - photomultiplicateur.

la gamme Leitz centré à 481 nm. Actuellement un filtre de Grubb-Parsons centré à 470 nm est employé. Les bandes passantes des deux filtres sont comparables : 12 et 10 nm respectivement.

Le faisceau primaire est éliminé quasi-complètement au niveau de l'épi-illuminateur, grâce au miroir dichroïque (Leitz TK 400) et un filtre d'arrêt avec une transmission nulle au-dessous de 430 nm (Leitz K 430). Ce ne sont donc que les fluctuations de l'émission à 470 nm qui sont perçues par la cathode du photomultiplicateur (EMI 9558 A). L'ensemble du matériel est fixé sur le statif d'un microscope (Orthoplan-Leitz), ce qui permet un alignement parfait des trajets optiques (Fig. 13).

Le signal sortant du photomultiplicateur est amplifié et filtré si nécessaire ; les constantes de temps le plus souvent utilisées étaient de l'ordre de 100 - 350 msec. Avec des constantes de temps plus courtes, des artéfacts liés au déplacement rythmique de la préparation peuvent apparaître. Les enregistreurs potentiométriques à faible vitesse de déroulement Watanabe (MC 411 Multi-pen recorder) ou Philips (PM 8100) équipé d'un décaleur d'origine (LI 853) ont été utilisés pour enregistrer les variations de l'émission fluorescente.

Le système tel qu'il vient d'être décrit ne permet qu'une étude des conditions redox intracellulaires des différents états stationnaires. Pour étudier la cinétique des transitions métaboliques des coeurs battants il faudra prévoir un certain nombre de modifications, dont trois sont essentielles :

- transformer le système en "double wave-lenght" fluorimètre, afin de pouvoir étudier les cinétiques rapides,

- remplacer l'enregistrement graphique par un oscilloscope à mémoire,

- enregistrer les phénomènes métaboliques simultanément avec les fluctuations de la pression intraventriculaire au cours d'une seule systole.

- b) Etude du degré de réduction des flavoprotéines et des cytochromes par spectrométrie épicardique

Au cours d'un stage dans la Johnson Research Foundation chez BRITTON CHANCE et à l'occasion d'un court séjour chez le Professeur D.W. LÜBBERS à Dortmund, nous avons pu réaliser quelques études spectroscopiques de la chaine respiratoire du coeur isolé en disposant du matériel de leurs laboratoires.

Le principe du spectroscope à double longueur d'onde que nous avons utilisé pendant ce travail est le suivant (Fig. 14). Grâce à un miroir vibrant (Brown Instrument Co Converter), la surface du coeur battant est éclairée alternativement (120 Hz) par deux faisceaus d'excitation. Le premier, faisceau de référence ayant une longueur d'onde fixe, provient du monochromateur M_R. Le deuxième, dont la longueur d'onde évolue en fonction du temps, est celui du monochromateur de mesure M_M (Bausch and Lomb Monochromator). La vitesse de balayage, ainsi que la largeur de la bande spectrale sont déterminées en fonction des besoins de chaque expérience particulière. La longueur de référence (λ_R) dépend également des conditions expérimentales don-

nées. La lumière réfléchie est captée par un photomultiplicateur et le signal sortant enregistré une fois ses deux composantes séparées par une bascule électroniques. Un deuxième beam-splitter (12 kH) et un deuxième PM (non dessinés sur le schéma) permettent de contrôler l'intensité du faisceau incident et d'exprimer les résultats en unités de densité optique (O.D.).

Dans nos conditions expérimentales, nous avons mesuré par réflection sur le coeur isolé perfusé les changements d'absorption dans la zone de 450-650 nm. Le λ_R a été choisi égal à 545 nm, longueur d'onde d'un point isosbestique déterminé auparavant sur le coeur arrêté, soumis à plusieurs transitions "normoxie-anoxie" (Fig. 24). Malgré les fluctuations considérables du potentiel redox cellulaire, l'absorption reste constante à cette longueur d'onde. Toute modification de l'intensité du signal ayant la longueur de 545 nm est donc liée à un déplacement de la préparation.

En fait, sur un coeur isolé, le signal de référence est en permanence modulé par les changements géométriques du ventricule gauche qui accompagnent les battements cardiaques. Il en est naturellement de même avec le signal de mesure, dont la longueur d'onde augmente progressivement à une vitesse de 20-100 nm/sec grâce à un moteur "pas à pas". Le temps de balayage de la bande spectrale étudiée (200 nm) est de 5-25 sec avec une résolution de 1-5 nm.

Il est évident, que pendant ce laps de temps, le coeur change plusieurs fois sa position (la fréquence cardiaque d'un coeur stimulé à 300 bpm est de 5 Hz). Pour pouvoir tracer le spectre d'absorption réel, il faut donc

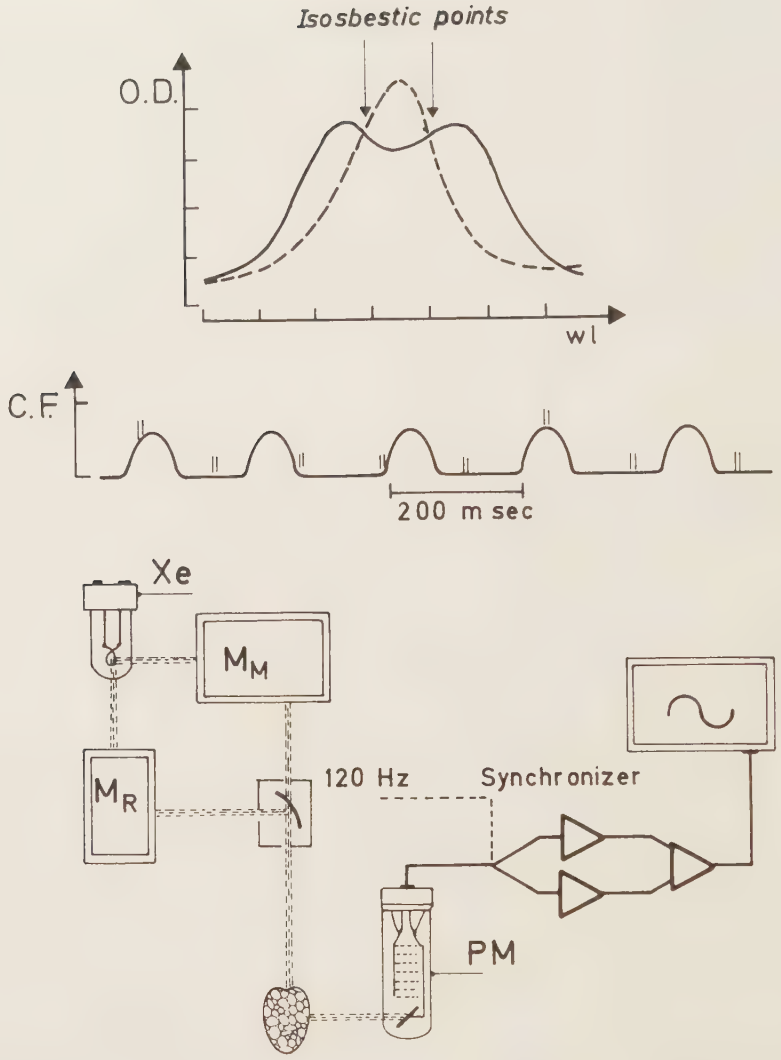


FIG. 14. PRINCIPE OPERATIONNEL DU SPECTROSCOPE A DOUBLE LONGUEUR D'ONDE (selon B. CHANCE).

Afin de pouvoir comparer l'absorption à deux longueurs d'ondes lue à deux différents instants du cycle cardiaque, il faut d'abord démoduler le signal en enlevant les artéfacts mécaniques liés au mouvements de la préparation. La surface du coeur battant avec une fréquence de 5 Hz est éclairée alternativement (f 120 Hz) par deux faisceaux lumineux : le faisceau de référence ( ) égal à un des points isosbestiques de la bande spectrale examinée, et le faisceau de mesure dont la longueur d'onde varie en fonction du temps. La différence entre les deux signaux est ensuite enregistrée. Xe - lampe à Xénon, M_R, M_M monochromateur de référence, monochromateur de pression, P_M - photomultiplicateur.

démoduler le signal de mesure en se servant des fluctuations du signal de référence, en principe constant. Cette opération est réalisable grâce aux systèmes électroniques conçus par les ingénieurs N. GRAHAM et V. LEGALLAIS dans les ateliers de la Johnson Research Foundation de l'Université de Pennsylvania (publication en préparation).

Le spectre différentiel initial ($O.D._M - O.D._R$) est ensuite stocké dans une mémoire digitale et ressort à chaque balayage suivant pour une lecture différentielle par rapport aux $O.D._M - O.D._R$ nouveaux. Les spectres différentiels ainsi corrigés sont alors enregistrés sur une table traçante (MOSLEY X-Y Recorder 7001 AM). L'évolution de l'absorption aux longueurs d'onde intéressantes (pics d'absorption des divers cytochromes) peut ainsi être quantifiée au cours de l'expérience.

5. Analyses biochimiques

Le matériel destiné à une analyse biochimique des taux tissulaires des composés riches en énergie, des métabolites du cycle de KREBS, ou des pyridine nucléotides a été traité de la façon suivante (WILLIAMSON, 345) :

Le coeur a été congelé entre deux blocs d'aluminium préalablement refroidis dans l'azote liquide (WOLLENBERGER,361). Sur un bloc de neige carbonique, (-50°C), les échantillons du myocarde ventriculaire ont été entourés dans une feuille d'aluminium et stockés dans l'azote liquide à - 150°C. Une série d'échantillons (16 au maximum) a été lyophylisée à froid pendant 12 heures, puis ramenée à la température ambiante dans un dessicateur. Chaque échan-

tillon a été ensuite pesé, déprotéinisé à 4°C par 3 ml d'acide perchlorique 0,6 M. Après l'homogénéisation et la neutralisation (K_2CO_3 3M dans triethanolamine), le surnageant, toujours gardé à 4°C, a été utilisé pour le dosage de quelques-uns des métabolites cités plus haut. Pour doser le NADH, une extraction alcaline (0,25 M KOH dans éthanol 50 v %) a remplacé l'emploi de l'acide perchlorique et les échantillons ont été neutralisés par le triethanolamine-HCl 1M pour ramener le pH à 8,5. L'addition de 10 µl de dithiothreitol 0,1 M à chaque échantillon neutralisé est nécessaire pour protéger les dérivés du coenzyme A (WILLIAMSON, 345).

Les métabolites dont les taux tissulaires sont faibles (pyruvate, CoA, NAD, NADH) ont été dosés par fluorimétrie (fluorimètre Eppendorf) et leurs concentrations ont été exprimées en nmoles/dgw. Les autres (citrate malate, lactate, ATP, AMP, CP) ont été dosés par photométrie (spectrophotomètre Jobin Yvon STAND MIV, photomètre Eppendorf) et leurs concentrations exprimées en nmoles/gdw.

6. Microscopie électronique

- a) Fixation in vivo par perfusion intra-aortique

Après anesthésie au nembutal, à la dose de 30 mg par kg, on perfuse sous une pression de 120 - 200 mmHg, in vivo, à l'aide d'un cathéter intra-aortique abdominal, une solution de glutaraldéhyde à 2,3 p. 100 dans un tampon de Cacodylate de Na 45 mM. Le coeur est arrêté en diastole, quelques secondes avant le début de la fixation, par injection dans la veine cave inférieure de 1 à 2 ml de chlorydrate de procaïne à 1 p. 100.

Le pH du fixateur est de 7,4, l'osmolarité de 290 à 320 mosmoles selon le lot de glutaraldéhyde employé. La perfusion d'une solution froide à 4°C est préférable. L'évacuation du coeur droit, nécessaire pour une bonne perfusion des coronaires, est assurée soit par ouverture de l'oreillette, soit par celle de la veine cave inférieure.

Dans ces conditions, le coeur est généralement bien fixé après passage des 50 premiers millimètres de fixateur, nous poursuivons jusqu'à 250 ml correspondant à une durée de perfusion de 5 min (HATT, 107).

- b) Fixation des coeurs isolés

Dans les expériences in vitro, sur les coeurs isolés, nous avons arrêté les battements cardiaques par une injection de procaïne dans la colonne aortique au dessus des artères coronaires. Le circuit de perfusion a été coupé par un robinet à 3 voies. Nous avons utilisé un fixateur légèrement hypertonique (2,3 p. 100 de glutaraldéhyde dans un tampon de Cacodylate de Na, 75 mM). Il nous a semblé que l'emploi des fixateurs hypertoniques permettait une fixation plus rapide sur des préparations souvent très hydratées (absence d'albumine dans le milieu de perfusion). L'évacuation du liquide sortant par les veines de Thebesius est une autre précaution à prendre pour assurer une fixation homogène de la paroi ventriculaire. Elle est facilement réalisable par une fine aiguille introduite au niveau de l'apex dans le ventricule gauche.

- c) Postfixation au tetroxide d'osmium

Le coeur est ensuite prélevé et disséqué. Des

fragments du muscle papillaire et de la paroi ventriculaire gauche sont isolés et mis pendant 1 heure dans le même fixateur.

Après lavage dans le tampon cacodylate de Na (150 mM, 300 mosm.) pendant 12 heures, les fragments tissulaires sont traités par une contre-fixation au tetroxyde d'osmium à 2 % pendant 1 min. La pureté des produits utilisés nous parait impérative pour assurer une bonne fixation (les produits MERCK pour la microscopie électronique ont été les seuls employés).

- d) Deshydratation et inclusion

Une deshydratation par des alcools de titre croissant (30° - 100°) est suivie d'un bain d'oxyde de propylène et d'une inclusion dans l'Epon selon LUFT (183).

Des coupes semi-fines ont été réalisées sur chaque bloc, pour une étude systématique au microscope à contraste de phase. Celle-ci permet en outre de repérer l'orientation tissulaire, le plan de section devant être orienté parallèlement à l'axe longitudinal des myocytes. Les fines sont obtenues sur l'ultramicrotome OmU2 (Reichert) ou sur un Porter Blum (Serval). Après la double coloration au Citrate de Plomb (REYNOLDS, 278) et à l'acétate d'uranyle, les coupes sont examinées au microscope Zeiss EM 9 A.

- e) Analyse morphométrique

L'étude de l'ultrastructure du myocarde ventriculaire a été dans certaines conditions complétée par une étude morphométrique, afin de quantifier les rapports existants entre les différentes structures cellulaires. Les techniques morphométriques décrites in exten-

so par WEIBEL (337), LOUD (176) et PAGE (239) ont été utilisées.

- Volumes fractionnels des structures cellulaires

Une coupe histologique peut être considérée comme une projection bidimensionnelle d'un volume tissulaire. On peut alors comparer les volumes fractionnels de différentes structures cellulaires à partir des fréquences avec lesquelles leurs images peuvent coincider avec les points d'intersection d'une grille régulière, superposée sur la photographie de la coupe. Certaines précautions sont cependant nécessaires pour que le résultat d'une telle analyse soit significatif :

. le tissu doit être composé d'organites librement orientés,

. leur forme devrait s'inscrire dans un sphéroide,

. le choix des coupes doit être fait au hasard.

Nous sommes loin de satisfaire le deuxième point. Le premier, par contre, est respecté dans une certaine mesure, car, dans le myocarde ventriculaire de rat, les myofibrilles ne sont jamais strictement parallèles. La présence de nombreux espaces périnucléaires enlève également de l'homogénéité à l'aspect ultrastructural des cellules.

Dans notre travail, nous avons étudié les volumes occupés respectivement par les mitochondries (source d'énergie) et par les myofibrilles (lieu d'utilisation de l'énergie). Le rapport mitochondries/myofibrilles a été également calculé pour chaque cliché. 10 mi-

crographies par animal ne contenant pas le noyau, ni le tissu conjonctif ont été utilisées. Les mailles de la grille ont 10 mm de côté. Les moyennes pour chaque animal et par groupe ont été calculées.

- Nombre de mitochondries par unité de surface

Le nombre des mitochondries par unité de surface a été également calculé sur les mêmes micrographies. Un carré de 50 x 50 mm correspondant à 56, 1 $/\mu m^2$, compte tenu de l'agrandissement photographique, de la coupe tissulaire a été dessiné au hasard sur chaque photo et les résultats exprimés en nombre des mitochondries/100 $/\mu m^2$.

- Nombre de capillaires par unité de surface

Celui-ci a été déterminé sur les photo en contraste de phase (x 800). Les coupes transversales ont été utilisées et les résultats exprimés en nombre de capillaires/mm^2. Les moyennes pour chaque animal et pour chaque groupe ont été calculées et les méthodes statistiques standard, ont été employées pour analyser les résultats (test t, analyse de variance).

B. - RESULTATS ET DISCUSSION

B. I. Corrélation entre l'ultrastructure et la fonction des mitochondries cardiaques in situ :

1. Analyse ultrastructurale des lésions cardiaques provoquées par l'isoprotérénol

Le choix de ce sujet de recherche, qui nous a conduit ultérieurement vers une étude plus systématique,

se base sur des circonstances purement fortuites. Venant en France comme boursier, j'ai voulu compléter les études de l'Unité de Pathologie du Métabolisme cardiaque (Prague, Prof. O. POUPA) par quelques éléments nouveaux, afin de mieux comprendre la cause de la nécrose cardiaque provoquée par les catécholamines (POUPA, 258 ; OSTADAL,233). L'Unité de Pathologie Cardiovasculaire du Prof. P.Y. HATT était le meilleur endroit pour un tel projet.

On savait depuis 1959 (RONA, 271) qu'une surcharge en isoprotérénol, sympathomimétique de type β, peut induire des lésions myocardiques, dont le mécanisme restait cependant mal compris. Les possibilités suivantes ont été discutées :

- ralentissement de la respiration secondaire à une ischémie myocardique provoquée par la chute de la pression artérielle périphérique (RONA, 271) ;

- surmenage de la chaine respiratoire provoqué par le surcroit de travail cardiaque, dépassant la capacité maxima des systèmes impliqués dans le transport d'oxygène au tissu (hypoxie relative - RAAB, 261) ;

- déséquilibre de l'homéostasie ionique des cellules cardiaques (ROSENMANN, 281 ; FLECKENSTEIN, 76).

Selon les informations largement répandues dans la littérature, il nous a semblé que la microscopie électronique pouvait aider à faire le choix entre les trois mécanismes proposés. Les altérations mitochondriales décrites au microscope électronique dans les coeurs ischémiques (JENNINGS, 121 ; HERDSON, 112), hypoxiques (BÜCHNER, 21 ; OVNISHI, 227) et après corticostéroïdes (D'AGOSTINO, 63) ont été en effet assez différentes.

L'existence d'une corrélation entre l'activité respiratoire et l'aspect ultrastructural des mitochondries avait été d'ailleurs suggérée par les résultats obtenues in vitro (HACKENBROCK, 95).

Ce travail avait également un certain intérêt pour les réanimateurs qui utilisent fréquemment les divers catécholamines au cours des urgences cardiaques (bradycardies, collapsus circulatoire). Quel que soit le mécanisme exact de la nécrose cardiaque, sa présence en soi nous a paru un argument suffisamment alarmant pour mettre en garde contre un emploi abusif de ces drogues.

- a) Matériel et méthodes

L'expérience a porté sur 30 rats adultes, mâles, de souche Wistar. L'isoprénaline (Isuprel Winthrop) a été injectée s.c. à la dose de 40 ou 80 mg/kg en solution isotonique contenant 1 mg/ml de métabisulfite de sodium.

Trois groupes de 8 rats chacun ont été sacrifiés, 1, 3 et 6 heures après l'injection. Un groupe de 6 rats a servi de contrôle. La fixation a été faite in vivo après une anesthésie légère. Le fixateur (2,5 % glutaraldéhyde) a été dilué dans un tampon phosphate 0,15 M. La suite de la procédure ne diffère pas de la technique décrite dans le chapitre précédent.

- b) Résultats

Les myocarde de contrôle ont la structure décrite par MOORE et RUSKA (199) (Planches 1, 2, 30).

Les myofibrilles fixées en diastole sont nettement distinctes avec leurs bandes I, centrées par

la ligne Z, faites de filaments fins et leurs bandes A faites de filaments épais. Le réticulum sarcoplasmique, bien fixé par la glutaraldéhyde, se voit de part et d'autre de la ligne Z, sous forme de micro-vésicules isolées ou groupées en di- et triades.

Le noyau contient une chromatine homogène et un nucléole compact, la région périnucléaire et les espaces intermyofibrillaires contiennent des mitochondries à matrice dense avec leurs crêtes régulières et de nombreux grains opaques aux électrons (Planches 2, 21). Le sarcoplasme est riche en glycogène, quelques vacuoles lipidiques sont présentes, accolées aux mitochondries. Les grains de lipofuscine et un Golgi rudimentaire sont parfois présents dans les espaces périnucléaires.

Une heure après l'isoprotérénol, il n'y a pas de lésion cellulaire majeure ; seules, les modifications suivantes ont été observées :

. une déplétion diffuse en glycogène (Planche 3),

. une augmentation du nombre des vacuoles lipidiques (Planche 4),

. une diminution du nombre des grains intramitochondriaux et un éclaircissement de la matrice mitochondriale,

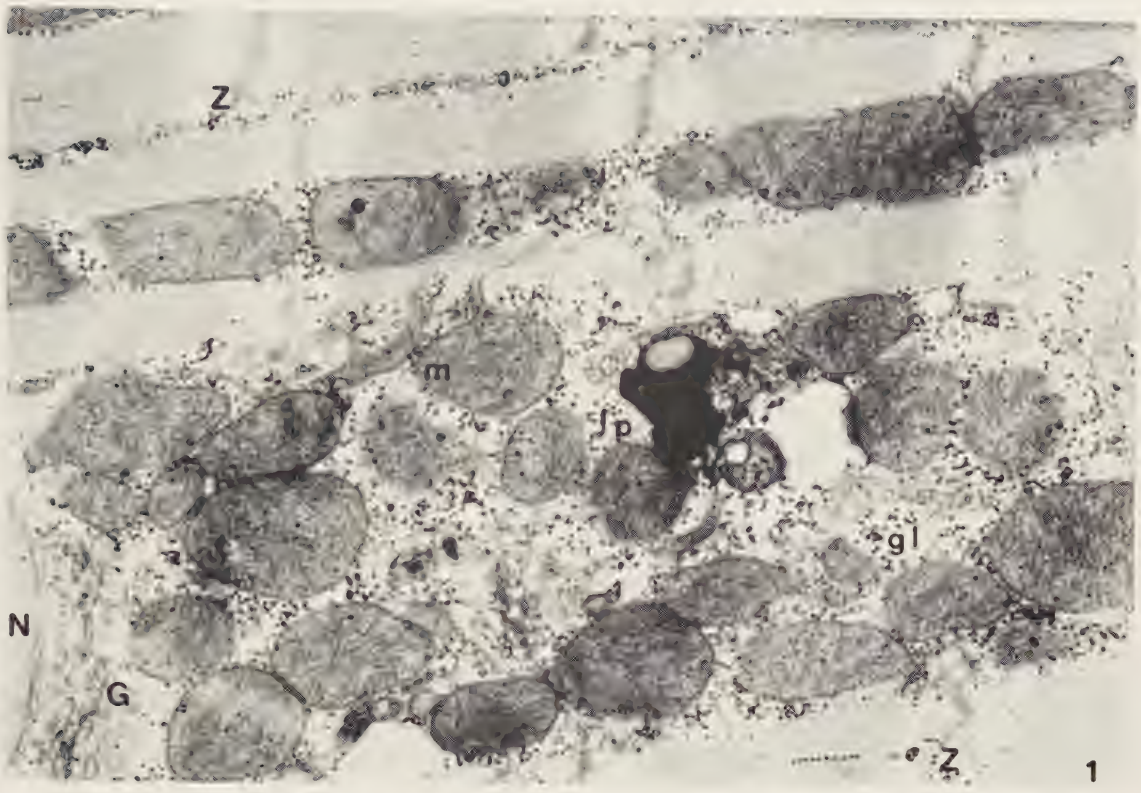
. un élargissement et une fragmentation du nucléole (Planche 29),

. des lésions myofibrillaires parcellaires, consistant dans une irrégularité des lignes Z et l'étirement des bandes I.

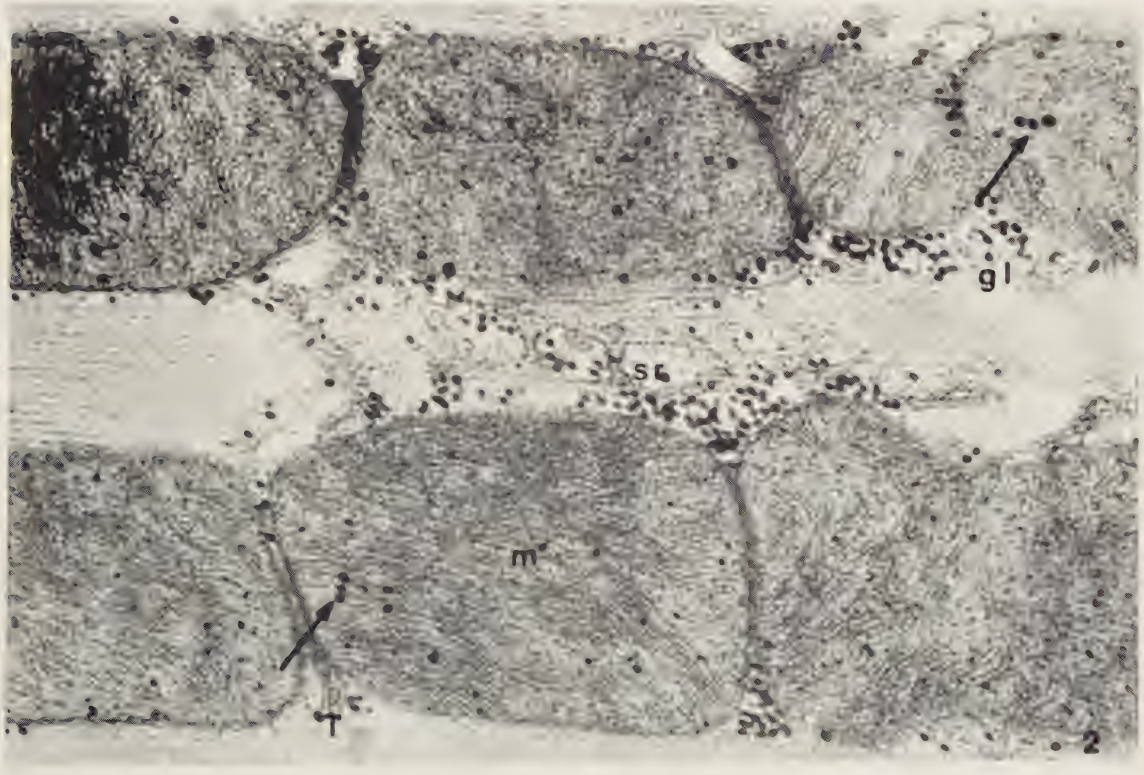
Trois heures après l'isoprotérénol, apparaissent les premiers foyers de nécrose cellulaire.

Planche 1. - Rat témoin : le coeur arrêté en diastole et fixé in situ par perfusion intracoronaire de Glutaraldéhyde dans un tampon phosphate. A noter quelques images de l'appareil de GOLGI (G) à proximité du noyau (N) et un cytoplasme riche en glycogène (gl) et en mitochondries (m). Les myofibrilles montrent une structure régulière avec leurs bandes A et I centrées par les lignes Z (Z) ; lp - grain de lipofushine ; x 21 000.

Planche 2. - Rat témoin : détail des mitochondries (m) avec une matrice dense contenant plusieurs corpus intracristam (↗) et des crêtes régulières ; gl : glycogène ; T - tube transversal ; sr - réticulum sarcoplasmique lisse ; x 49 000.



1

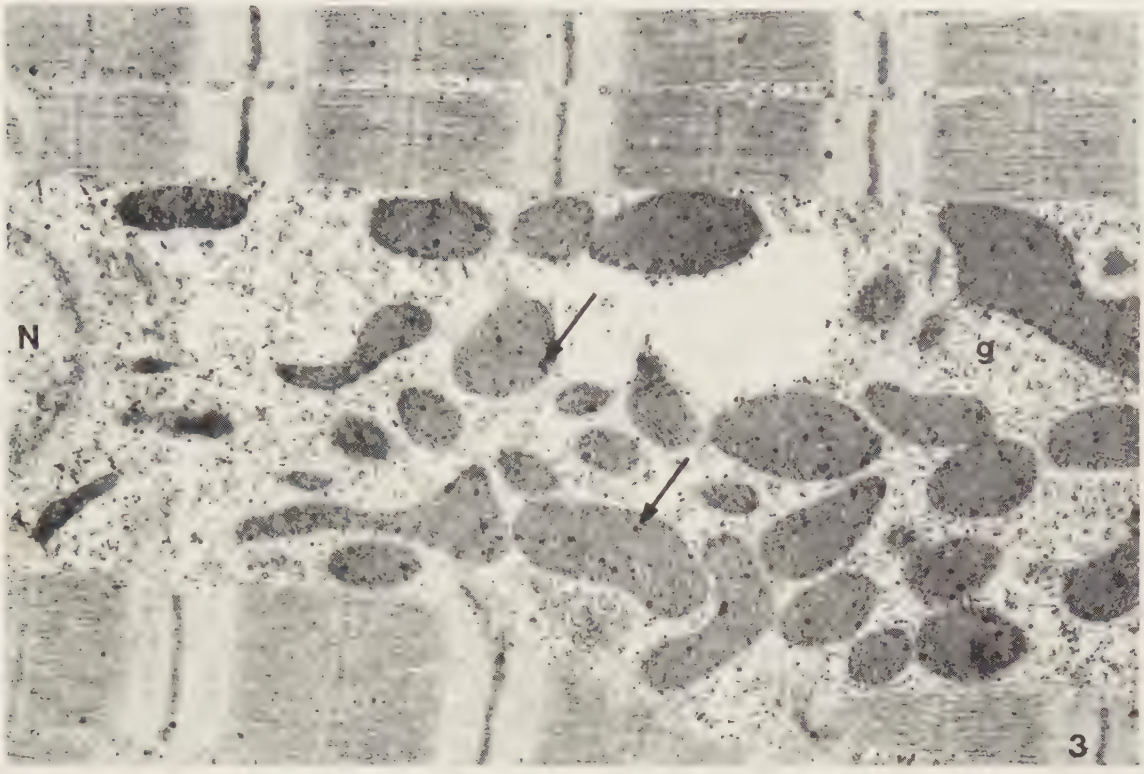


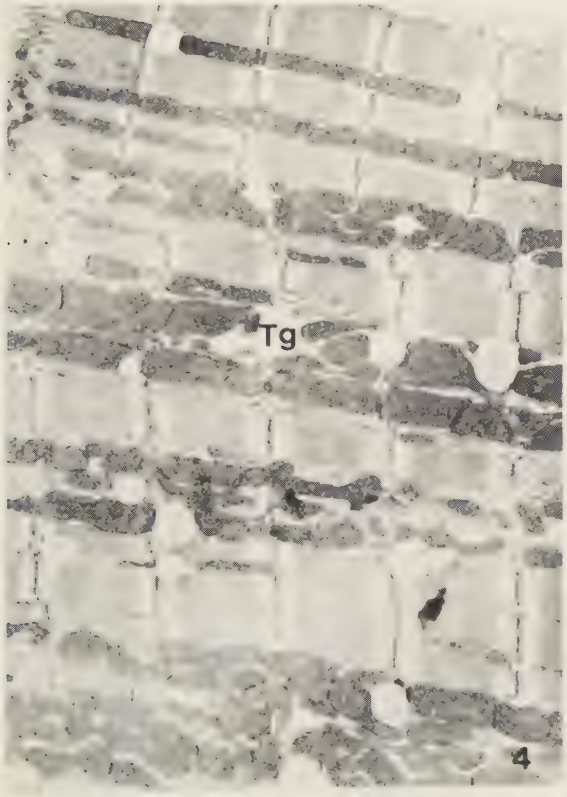
2

Planche 3. - 6 heures après l'isoprotérénol : augmentation du nombre de corpus intracristam (↗), déplétion en glycogène ; x 20 000.

Planche 4. - 1 heure après l'isoprotérénol : accumulation de nombreuses gouttelettes lipidiques (Tg) accolées aux mitochondries (m) ; x 6 500.

Planche 5. - 6 heures après l'isoprotérénol : apparition d'images lysosomiales (cl) ; x 20 000.


N
g
3


Tg
4

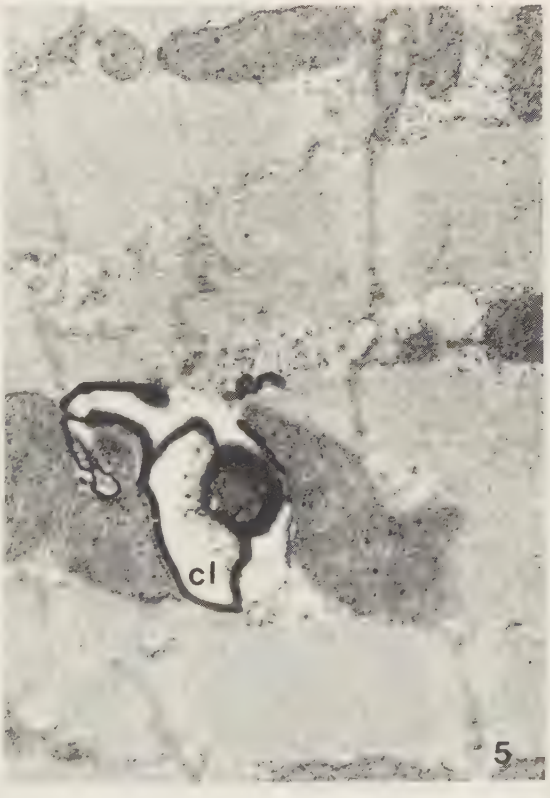
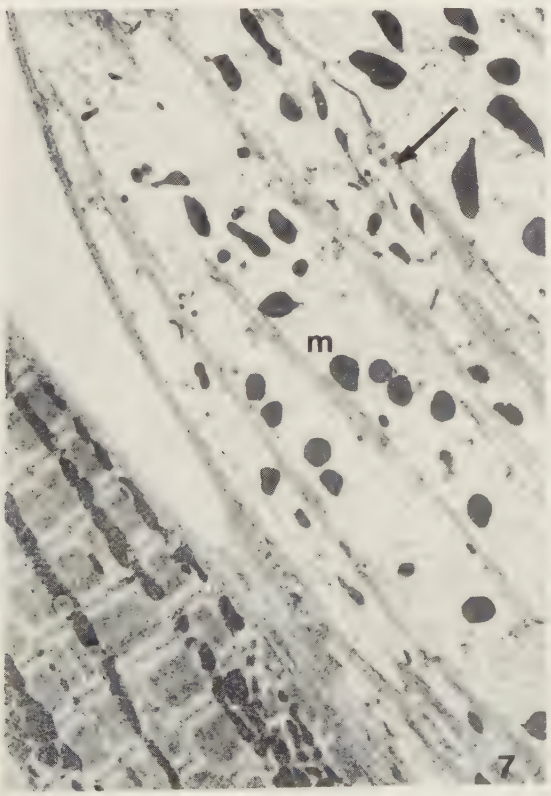

cl
5

Planche 6. - 3 heures après l'isoprotérénol : image d'une myolyse parcellaire. Etirement des lignes Z (Z) et disparition des filaments d'actine (↗) conduisant à une fragmentation des myofibrilles ; les mitochondries (m) subnormales avec les crêtes régulières, la matrice dense, disparition des grains intracristam ; x 20 000.

Planche 7. - 3 heures après l'isoprotérénol : deux cellules voisines dont l'une montre un aspect habituel, l'autre est le siège d'une myolyse diffuse (↗) accompagnée par un oedème intracellulaire ; les mitochondries (m) restent denses ; x 4 000.

Planche 8. - Myocarde ventriculaire de rat perfusé pendant 30 min avec 3,3 µg/min d'isoprotérénol ; myolyse diffuse (↗), accumulation des triglycérides (Tg) ; x 15 000.

Z
6


m
7

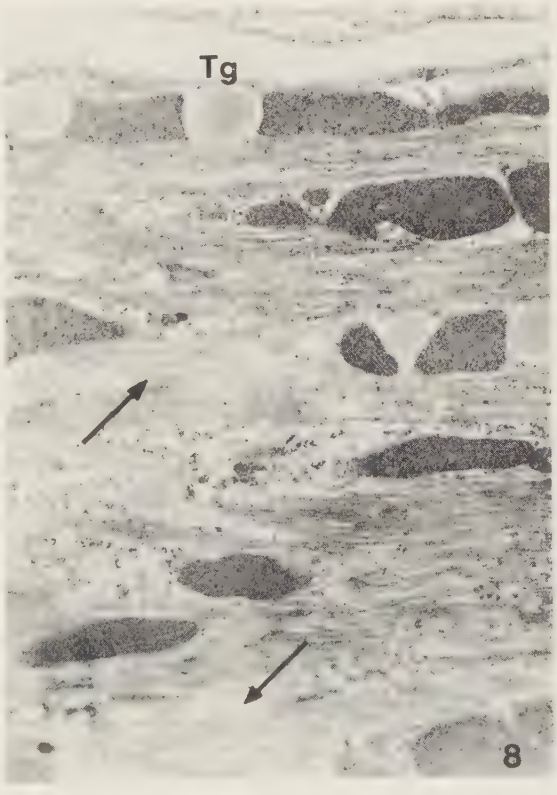

Tg
8

Planche 9. - 3 heures après l'isoprotérénol : oedème du système T (T) et apparition de dépôts cristalins (↗) à l'intérieur des mitochondries dont l'aspect général reste par ailleurs conservé ; x 30 000.

Planches 10 et 11. - 3 heures après l'isoprotérénol : de nombreux dépôts microcristallins (↗) et quelques images de figures myéliniques (mf). Lésions mitochondriales importantes ; x 50 000.

T
9

mf

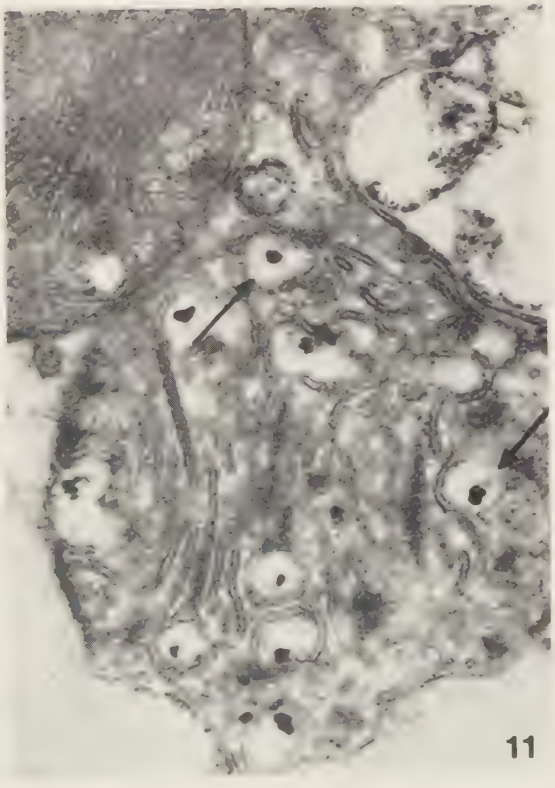
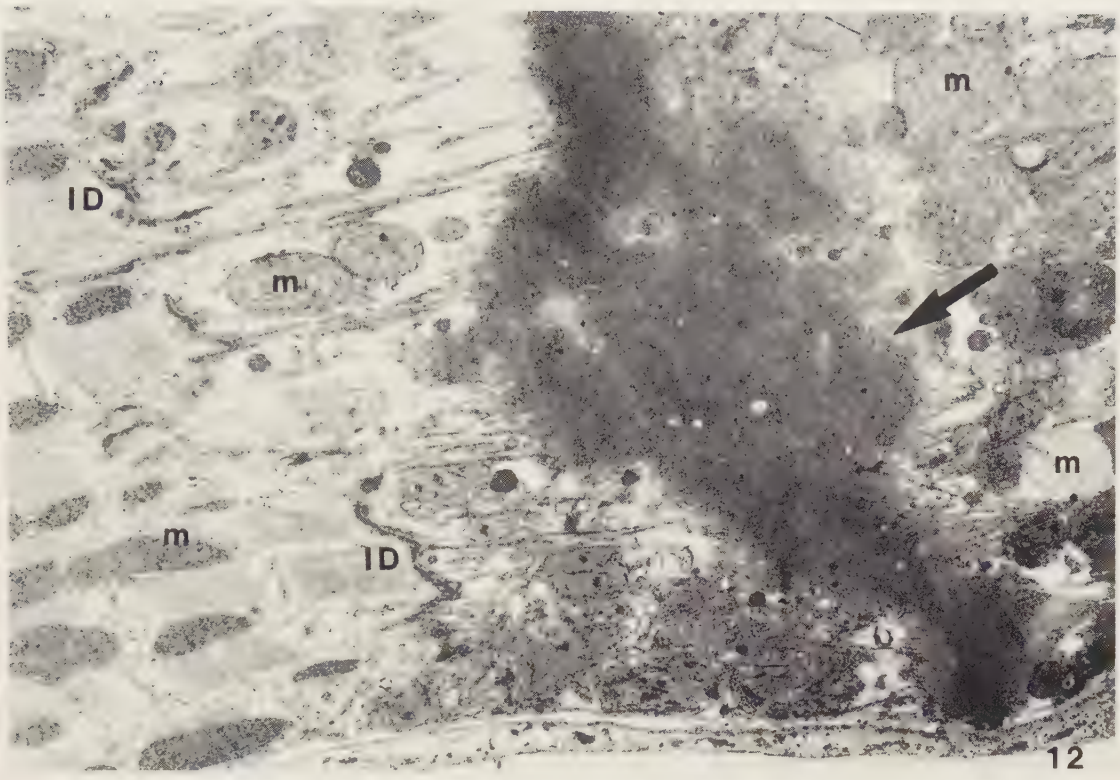

11

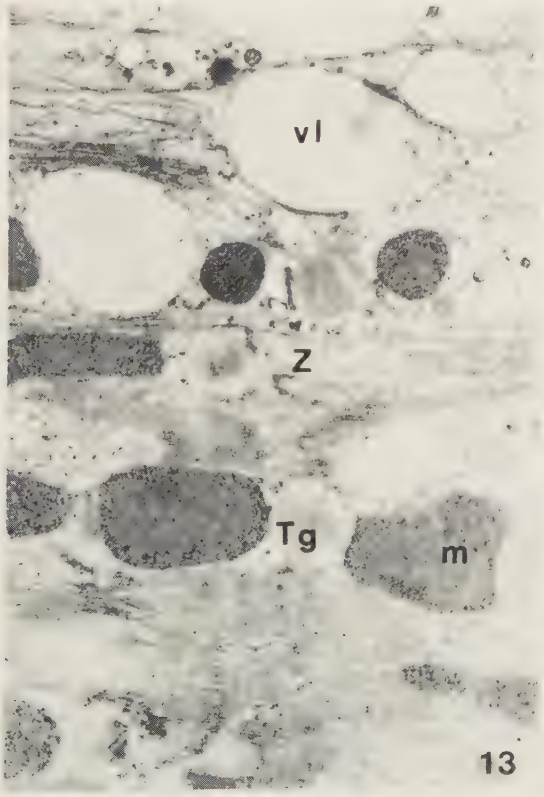
Planche 12. - 3 heures après l'isoprotérénol : deux cellules voisines séparées par un disque intercalaire (ID). Celle de gauche subnormale, l'autre est le siège d'une myolyse diffuse : bande de contraction (↗), altérations mitochondriales (m) importantes ; x 9 000.

Planche 13. - 6 heures après l'isoprotérénol : vacuolisation du cytoplasme (vl) et lésions myofibrillaires (Z). Quelques gouttelettes lipidiques (Tg) sont également présentes ; x 14 000.

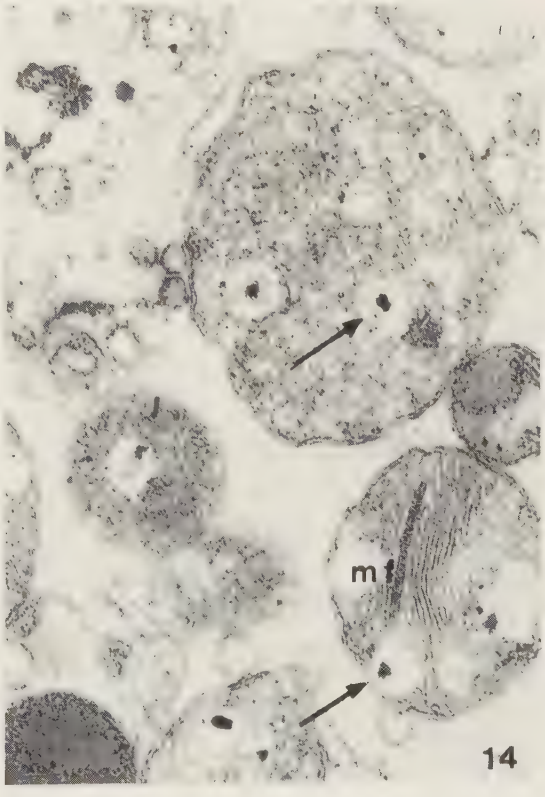
Planche 14. - 6 heures après l'isoprotérénol : dépôts calciques à l'intérieur des mitochondries (↗) ; mf - figures myéliniques ; x 50 000.



12



13

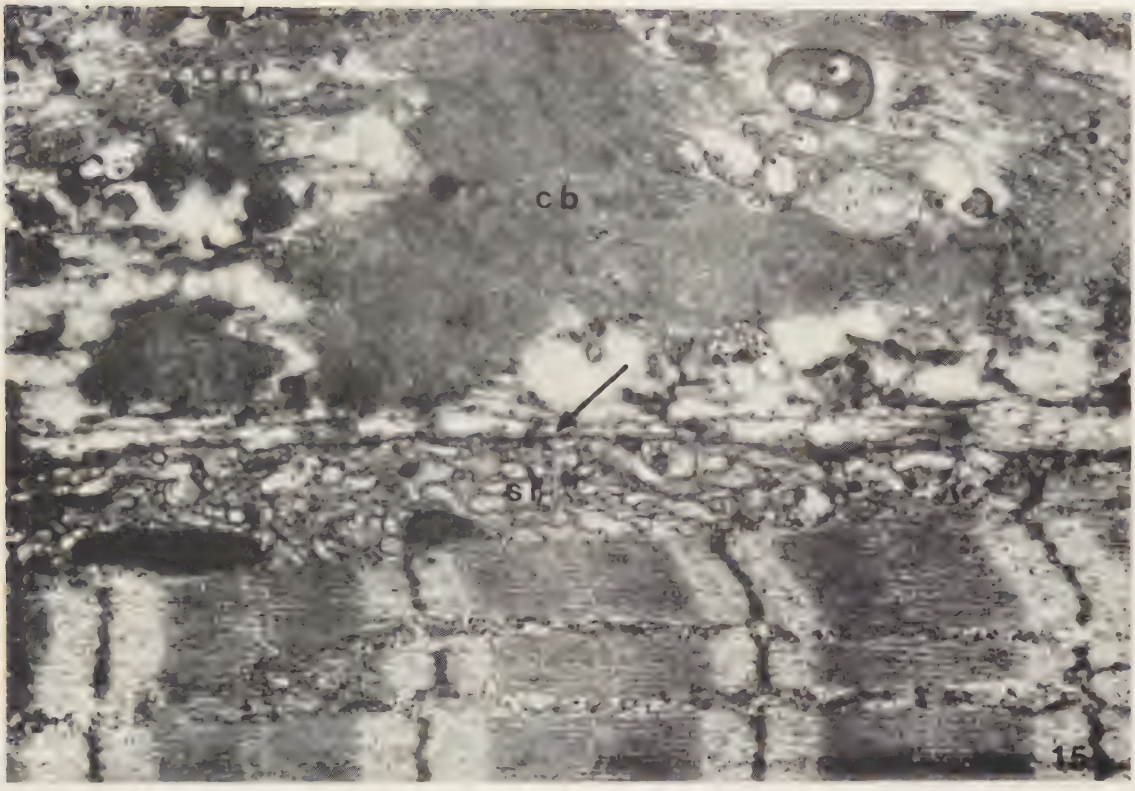


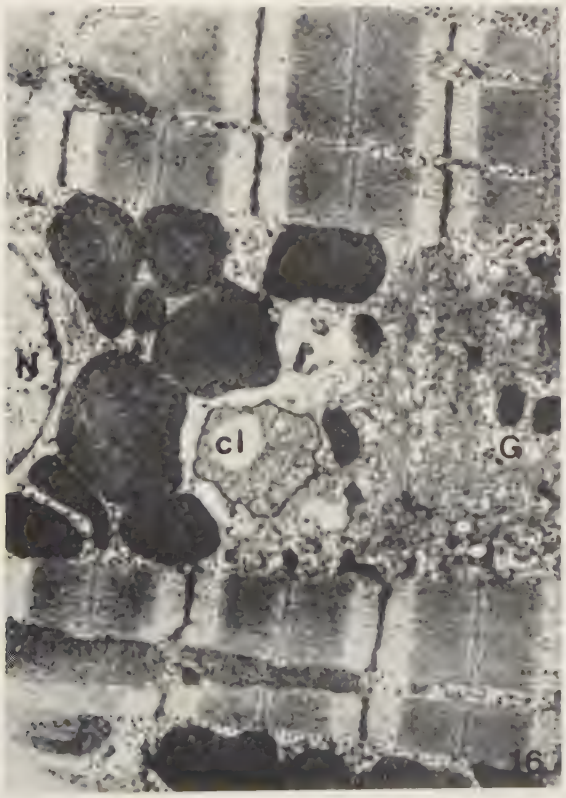
14

Planche 15. - 6 heures après l'isoprotérénol : hyperplasie du réticulum sarcoplasmique lisse (sr) sous le sarcolemme (↗) d'une cellule survivante avoisinant un foyer de nécrose ; x 22 000.

Planche 16. - 3 heures après l'isoprotérénol, cellule survivante:hyperplasie de l'appareil de GOLGI (G) dans une cellule adjacente au foyer de nécrose. N - noyau ; cl - cytolysosomes ; x 12 000.

Planche 17. - 3 heures après l'isoprotérénol, cellule survivante : hyperplasie du réticulum sarcoplasmique (sr) ; x 30 000.


cb
sl
15


N
cl
G
16

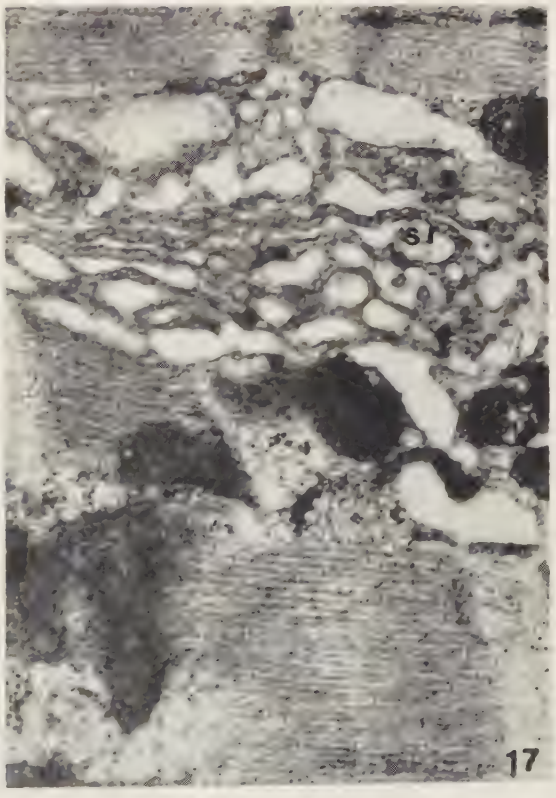
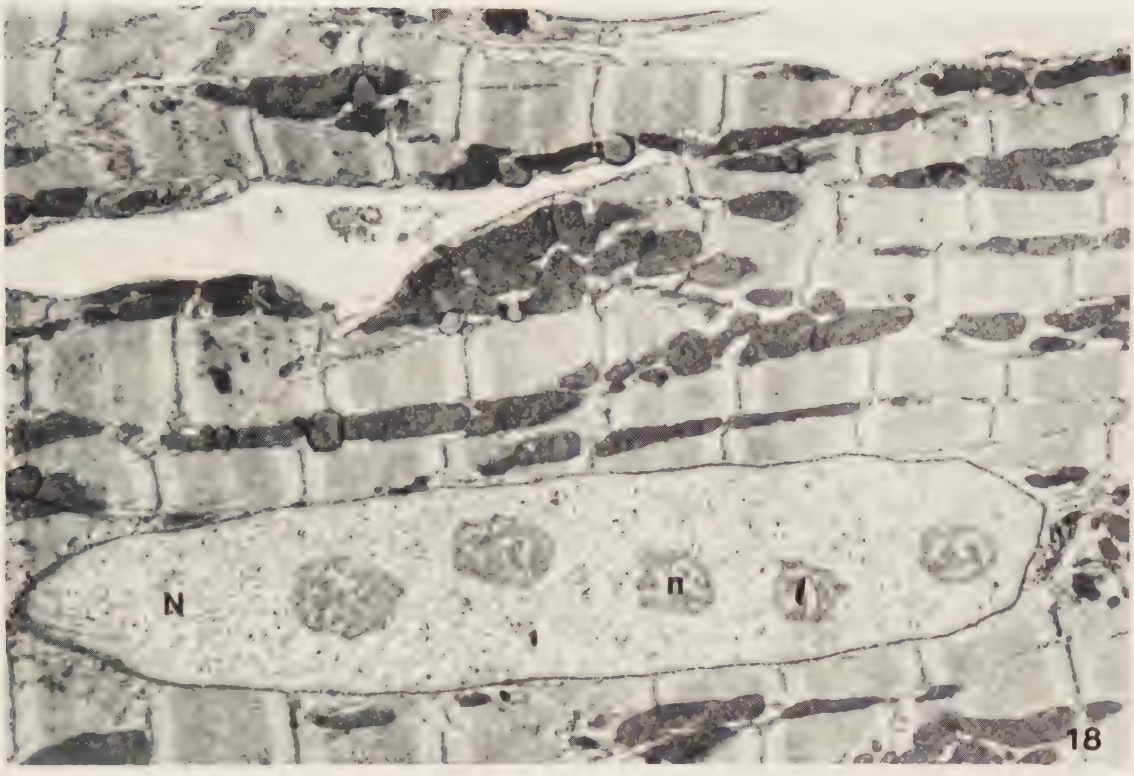
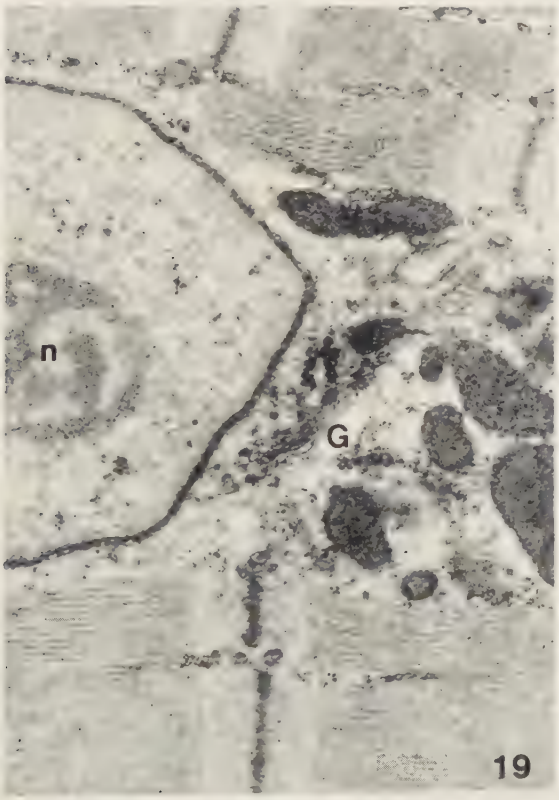

sl
17

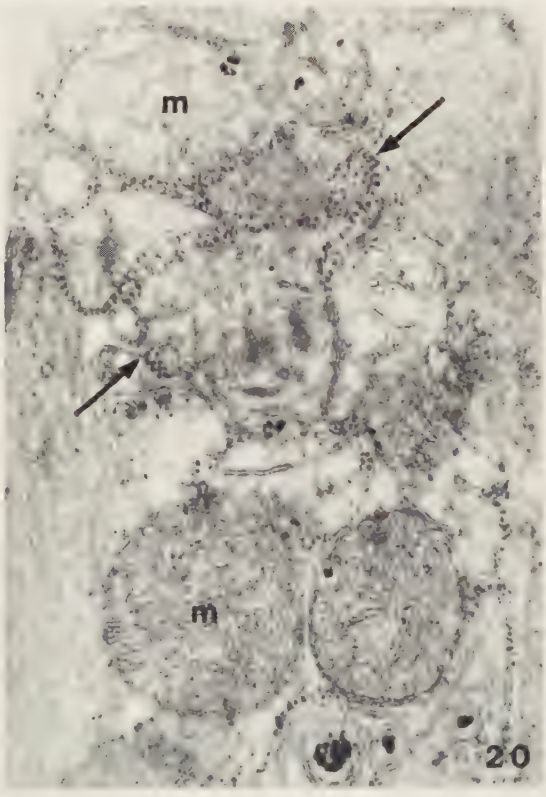
Planche 18. - 3 heures après l'isoprotérénol, cellule survivante, image de régénération : fragmentation du nucléole (n) ; x 9 000.

Planche 19. - 3 heures après l'isoprotérénol, cellule survivante, image de régénération : activation du nucléole (n), G - appareil de Golgi ; x 20 000.

Planche 20. - 3 heures après l'isoprotérénol : cellule nécrobiotique : à noter les lésions mitochondriales (m) et la présence de nombreux ribosomes libres et de polyribosomes (↗) ; x 45 000.


N
n
18


n
G
19


m
m
20

- Les cellules nécrobiotiques sont le siège de :

. lésions myofibrillaires majeures : raréfaction des filaments, surtout au niveau des bandes I dont certaines ont pratiquement disparu (Planche 6). Les bandes de contraction (Planche 12) et une coagulation du hyaloplasme (Planche 15) sont les images fréquemment rencontrées à ce stade ;

. les mitochondries peuvent parfois conserver leur structure habituelle, même en présence d'une myolyse importante (Planche 7, 8). Pour les cellules les plus endommagées une accumulation des dépôts cristallins, (vraisemblablement des sels calciques) (Planche 10) et une destruction totale de l'architecture mitochondriale (Planche 11) peuvent, par contre, être observées ;

. picnose du noyau et margination de la chromatine, aberrations nucléolaires.

-Les cellules voisines présentent, elles aussi, des lésions myofibrillaires, mais moins prononcées, généralement localisées à la strie Z. Les mitochondries y paraissent normales le plus souvent, mais certaines d'entre elles contiennent une quantité anormalement grande de grains intramitochondriaux (Planche 9).

On voit fréquemment une prolifération considérable de doubles membranes dont la plupart appartient au réticulum endoplasmique lisse (Planche 15, 17), d'autres sont d'origine golgienne (Planche 16). Dans le noyau, la division du nucléole en deux à cinq fragments témoigne d'une activité protéosynthétique accrue (Planche 18). Celle-ci est d'ailleurs suggérée par l'apparition de ribosomes libres et de polyribosomes (Planche 20) dans les zones périphériques de la nécrose.

6 heures après l'isoprotérénol, les foyers nécrotiques sont plus étendus et plus nombreux, le contenu des lésions étant comparable à celui du groupe précédent (Planche 14). Un fait important : la structure des mitochondries peut dans certaines cellules nécrobiotiques rester quasi normale, malgré une myolyse diffuse (Planche 13, 15).

Les cellules voisines sont riches en lipides, le réticulum sarcoplasmique y est hypertrophié (Planche 15) et de nombreuses anomalies nucléolaires sont régulièrement présentes. Les cytolysosomes contenant les restes des mitochondries (Planche 5) ou d'autres organites sont souvent rencontrés. La réaction interstitielle est mineure. Elle est surtout marquée par un oedème intercellulaire, la réaction inflammatoire est absente.

- c) Discussion

Plusieurs points importants ressortent de ce travail :

- caractère focal des lésions : au cours d'une inspection en contraste de phases, les lésions rencontrées ne sont pas généralisées, mais distribuées en foyers. C'est d'ailleurs le cas de la plupart des myocardites expérimentales (10, 15, 64, 77, 185). Cet aspect banal des lésions ne facilite pas la compréhension du mécanisme exact de la nécrose cellulaire provoquée par l'isoprotérénol ;

- altérations prénécrotiques : la déplétion en glycogène et l'accumulation des lipides peuvent être facilement interprétées en fonction de ce que nous savons sur les effets métaboliques des catécholamines

(CHALLONER, 29 ; REGAN, 272 ; WILLIAMSON, 350, 351 ; KRASKOW, 146 ; KRUGER, 155).

Il est bien connu, que les sympathomimétiques accélèrent la glycogénolyse (WILLIAMSON, 350 ; KREISBERG, 154 ; NEWSHOLME, 220) ce qui permet d'expliquer la déplétion en glycogène. La mobilisation périphérique des triglycérides (WENKE, 340) et une utilisation accrue des acides gras libres (OLSON, 226 ; STEIN, 317, 318 ; REGAN, 272) modifient sensiblement les conditions redox intracellulaires (KRAUPP, 147) favorisant ainsi la synthèse des triglycérides à l'intérieur des cellules cardiaques (KRUGER, 155 ; REGAN, 272). Les groupements glycérol, nécessaires à une telle synthèse, sont vraisemblablement fournis par la glycolyse simultanément activée (REGAN, 272 ; WILLIAMSON, 348).

L'éclaircissement discret de la matrice et la disparition des grains intramitochondriaux étaient, dans l'état actuel de nos connaissances, plus difficiles à interpréter exactement. Souvent ces aspects morphologiques ont été considérés comme un reflet fidèle d'une hypoxie tissulaire (BÜCHNER, 21 ; SULKIN, 321)

Des images semblables ont été cependant décrites dans des conditions très différentes quant à la vitesse de la respiration et l'efficacité de l'oxydation phosphorylante : hyperthyréose (CALLAS, 26), effort cardiaque (BISHOP, 10) intoxication par le dinitrophénol (POCHE, 254), avitaminose E (Van VLEET, 333), avitominose B (BOZNER, 15), perfusion acalcique du coeur isolé (BURGOS, 22 ; YATES, 365). De plus, nous les voyons régulièrement dans les coeurs mal fixés (HATT et MORAVEC, 107).

Cette omniprésence du gonflement mitochondrial nous a fait douter d'une signification fonctionnelle précise. Afin de mieux comprendre ces images "hypoxic-like" il nous a paru utile de revoir l'aspect des mitochondries réellement hypoxiques et vérifier l'existence d'une corrélation entre l'aspect ultrastructural et l'état respiratoire des mitochondries, comme elle a été décrite au niveau des mitochondries isolées (HACKENBROCK, 95 ; GREEN, 89 ; LEHNINGER, 167) et dans les cellules intactes (HACKENBROCK, 97).

Ce travail, faisant l'objet de protocoles expérimentaux ultérieurs, devait nous permettre de mieux connaître les possibilités et les limites de la microscopie électronique comme technique d'étude de l'état métabolique des mitochondries cardiaques fixées in vivo.

- La nécrose cellulaire : un certain nombre de ses aspects rassemble des faits disparates de classement difficile. Deux altérations paraissent particulièrement fréquentes à ce stade : - les lésions myofibrillaires sélectives et - les dépôts calciques à l'intérieur des mitochondries.

Selon les travaux récents, leur origine pourrait être la même : surcharge des cellules cardiaques en acides gras et en calcium. En effet, les catécholamines stimulent le flux entrant du calcium (CORABOEUF, 58, 59 ; VASSORT, 328, ROUGIER, 285 ; GARNIER, 82) et augmentent la concentration intracellulaire du calcium libre (FLECKENSTEIN, 76). Ce dernier peut être activement capté par les mitochondries (LEHNINGER, 169 ; VASINGTON, 327) et stocké sous forme

d'hydroxyapatite (PEACHEY, 247), ou il peut être saponifié en présence d'acides gras, également captés en excès (JENNINGS, 275 ; DE LEIRIS, 65).

L'existence de protéases calcium-dépendantes, ayant une affinité sélective pour les protéines de la bande I et de la ligne Z, a été signalée par BUSCH (24). Certains auteurs (STROHER, 320) leur attribuent un rôle important dans le développement des lésions sélectives des myofibrilles. On ne peut cependant pas exclure la possibilité d'altérations tout à fait non spécifiques, communes à la plupart des nécroses cardiaques quelle que soit leur origine.

La lyse sélective des myofibrilles a été décrite dans de nombreuses conditions expérimentales telles qu'un surmenage mécanique (HATT, 104), une hypokaliémie chronique (MAURAT, 185), une intoxication par le plasmocid (D'AGOSTINO, 62), l'émétine (HATT,103) pour ne prendre que les plus classiques. Les dépôts calciques à l'intérieur des mitochondries ont été également rencontrés dans des conditions les plus diverses : ischémie (JENNINGS, 121 ; HEGGTVEIT, 115), hypokaliémie (MAURAT, 185), ou hypomagnésiémie (HEGGTVEIT, 110) chronique, intoxication par les corticostéroïdes (D'AGOSTINO,63).

L'existence d'une surcharge calcique et d'une myolyse sélective dans un aussi grand nombre de nécroses expérimentales plaiderait donc en faveur de la non spécificité de ces lésions.

- Cellules survivantes, réparation des lésions : dans les cellules survivantes de nombreux indi-

ces "d'hyperactivité" ont été observés. Les altérations les plus flagrantes sont les suivantes :

.une prolifération du reticulum sarcoplasmique lisse, similaire à celle décrite par BÜCHNER (21) dans les stades de réparation des lésions anoxiques ;

.une activation de l'appareil génétique ayant une importance certaine pour le réparation des lésions cellulaires, mais reflètent aussi l'activation de la protéosynthèse conduisant à une hypertrophie cardiaque (TUREK, 265 ; POUPA, 259).

2. Analyse ultrastructurale des répercussions d'une hypoxie myocardique subaiguë.

Pour mieux comprendre la signification des lésions myocardiques décrites plus haut, nous avons entrepris une étude systématique ayant pour but la vérification de la corrélation entre l'aspect morphologique et l'état fonctionnel des mitochondries cardiaques fixées in situ (FORSSMANN, 79 ; HATT, 107). Tout d'abord il nous a paru nécessaire de revoir l'ultrastructure des mitochondries hypoxiques. Ce travail a été réalisé en collaboration avec les Docteurs E. REICHART (INSERM, Unité de Pathologie Respiratoire, Nancy) et I. FRIEDMAN (Hadassah Medical School, Jérusalem).

- a) Matériel et méthode

L'expérience a porté sur 40 rats adultes de souche Wistar. La répartition des animaux est indiqué dans le tableau suivant :

Groupe	Nombre d'animaux	Contenu d'O_2 dans l'atmosphère	durée de l'expérience
I	8	6 %	2 heures
II	12	9 %	10 jours
III	10	9 %	30 jours
IV	10	21 %	Témoins

TABLEAU I.

Les animaux ont été tenus dans des cages placées à l'intérieur d'une enceinte d'1 m^3, dont l'humidité et la température restaient constantes grâce aux systèmes de contrôle réalisés par E. REICHART (273). Le pourcentage d'oxygène dans l'atmosphère de la chambre était - soit de 6-7 %, soit de 9-10 % - ce qui représente une hypoxie sévère (SULKIN, 321) ; tout le CO_2 produit par les animaux a été éliminé chimiquement. La composition des échantillons gazeux a été contrôlée plusieurs fois par jour à l'aide d'un analyseur adéquat (Mono-Duplex Gas Analyser).

A la fin de l'expérience les animaux ont été placés dans une petite cage de 6 l, contenant le même mélange gazeux et ils ont été sacrifiés, étant toujours hypoxiques.

- b) Résultats

La structure des coeurs hypoxiques ne montre aucune anomalie particulière. Au microscope optique, à aucun stade de l'expérience, nous n'avons vu de lésions musculaires, ni de foyers de fibrose. La densité des capillaires semblait plus grande après 10 et 30 jours d'hy-

poxie (Planches 28, 29). Cette impression a été confirmée par les résultats de l'analyse morphométrique (Planche 29, tableau 2).

L'aspect ultrastructural des mitochondries était sensiblement normal (Planche 21). La matrice restait dense, conservait ses grains opaques aux électrons (Planche 22), même après un mois de séjour en atmosphère pauvre en oxygène. Jamais nous n'avons vu les fragmentations des crêtes décrites auparavant après fixation par immersion.

Dans l'ensemble du matériel examiné, les mitochondries des coeurs hypoxiques paraissent cependant plus petites et plus nombreuses (Planches 24, 25). Les résultats de l'analyse morphométrique confirment en effet une augmentation du nombre des mitochondries par $100/u^2$ de coupe tissulaire (tableau 2). Par contre, le volume relatif des mitochondries reste pratiquement constant. Il s'ensuit que la taille moyenne des mitochondries diminue significativement au cours de l'hypoxie. Le rapport mito/myo, reflètant les relations existant entre les masses des structures fabriquant et consommant l'énergie, augmente parallèlement et plafonne significativement au dixième jour (Tableau 2).

- c) Discussion

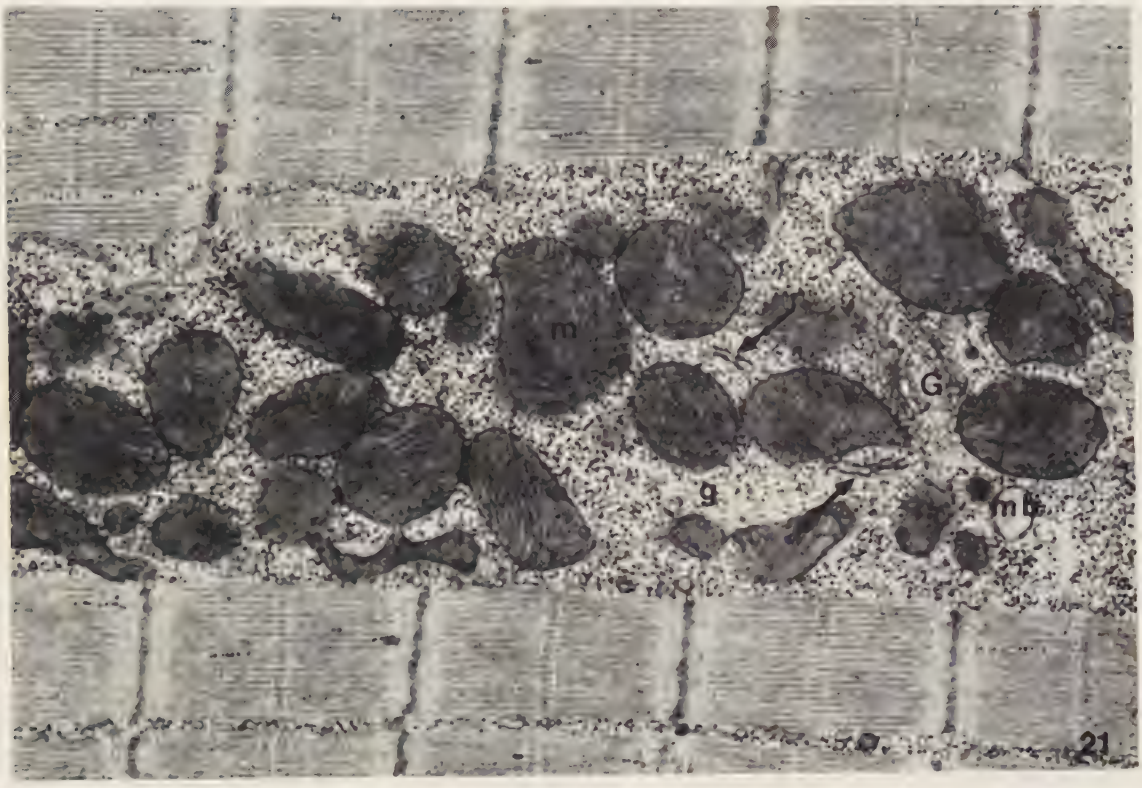
Les points les plus importants de ce travail sont les suivants :

. l'absence des lésions mitochondriales, nous a relativement surpris, car il a été généralement admis que les lésions mitochondriales, caractérisées par une clarification de la matrice, une fragmentation des

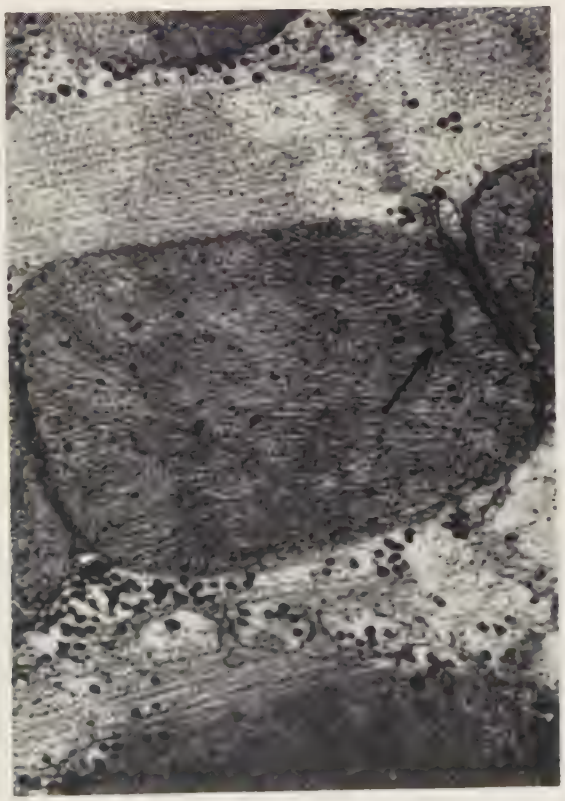
Planche 21. - Myocarde hypoxique (10 jours, 9 % O_2) ; absence de toute altération de l'ultrastructure cellulaire ; les mitochondries sont denses (m), le cytoplasme est riche en glycogène (g), quelques images de l'activation de la protéosynthèse peuvent être remarquées (↗) ; x 20 000.

Planche 22. - Détail de la planche précédente : structure des mitochondries quasi-normale : les crêtes sont régulières, la matrice relativement dense contient plusieurs grains intramitochondriaux (↗) ; x 50 000.

Planche 23. - Détail des mitochondries d'un coeur de contrôle. L'aspect ultrastructural est grossièrement celui de la planche précédente ; x 50 000.


m
G
g
mb
21

22

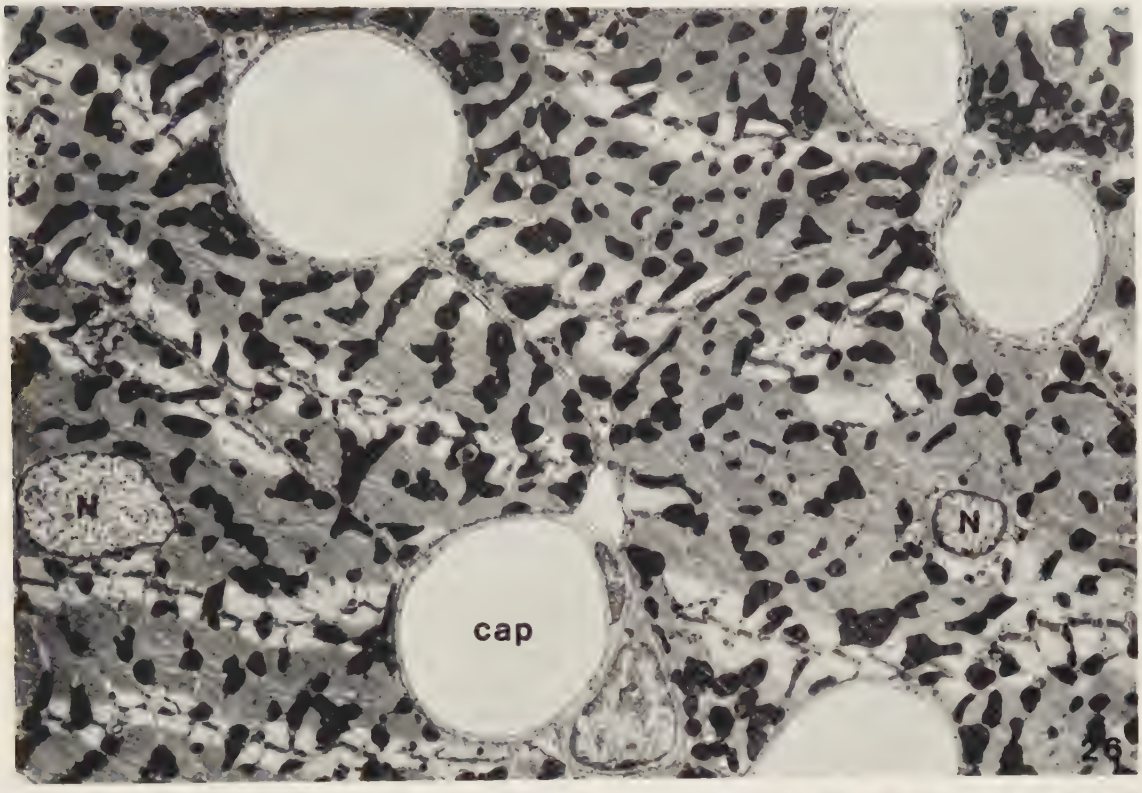


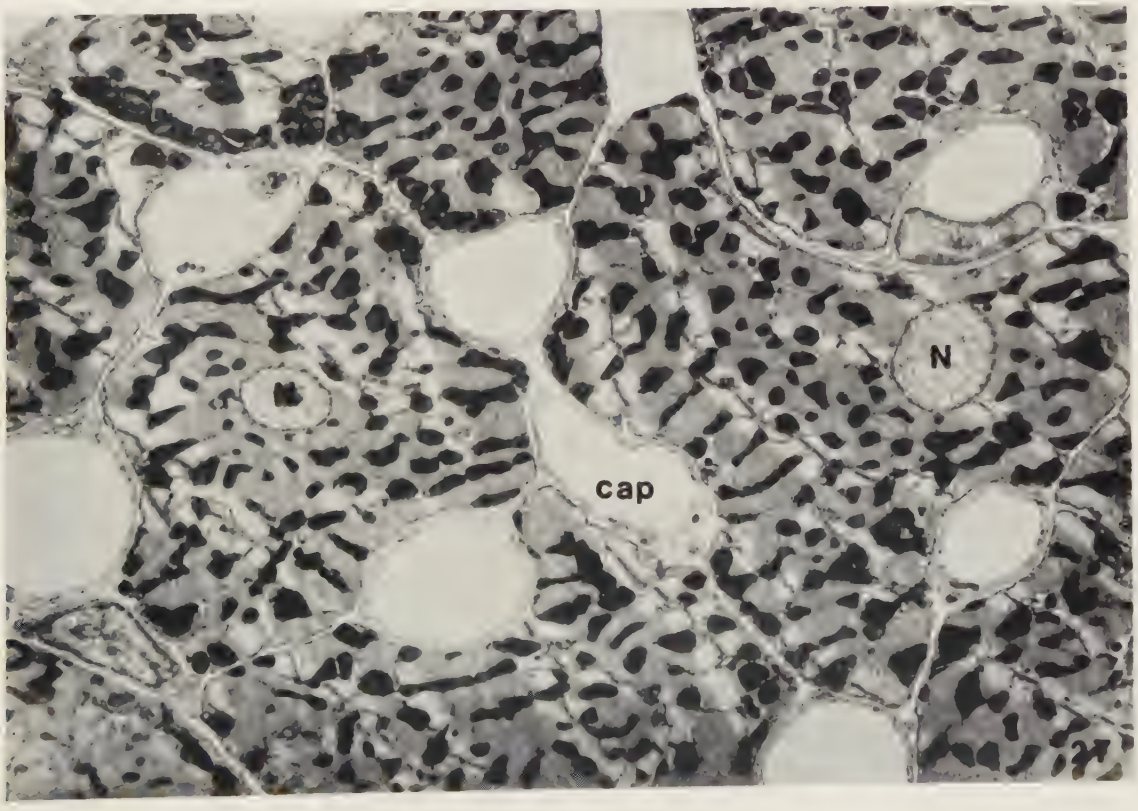
Planches 24 et 25. - L'ultrastructure des mitochondries d'un coeur témoin (Planche 24) et d'un coeur hypoxique (30 jours, 9 % O_2) : à part la taille des mitochondries qui diminue au cours de l'hypoxie, aucune altération de leur morphologie n'est à signaler. Grossissement identique pour les deux planches : x 45 000.

m
g
24

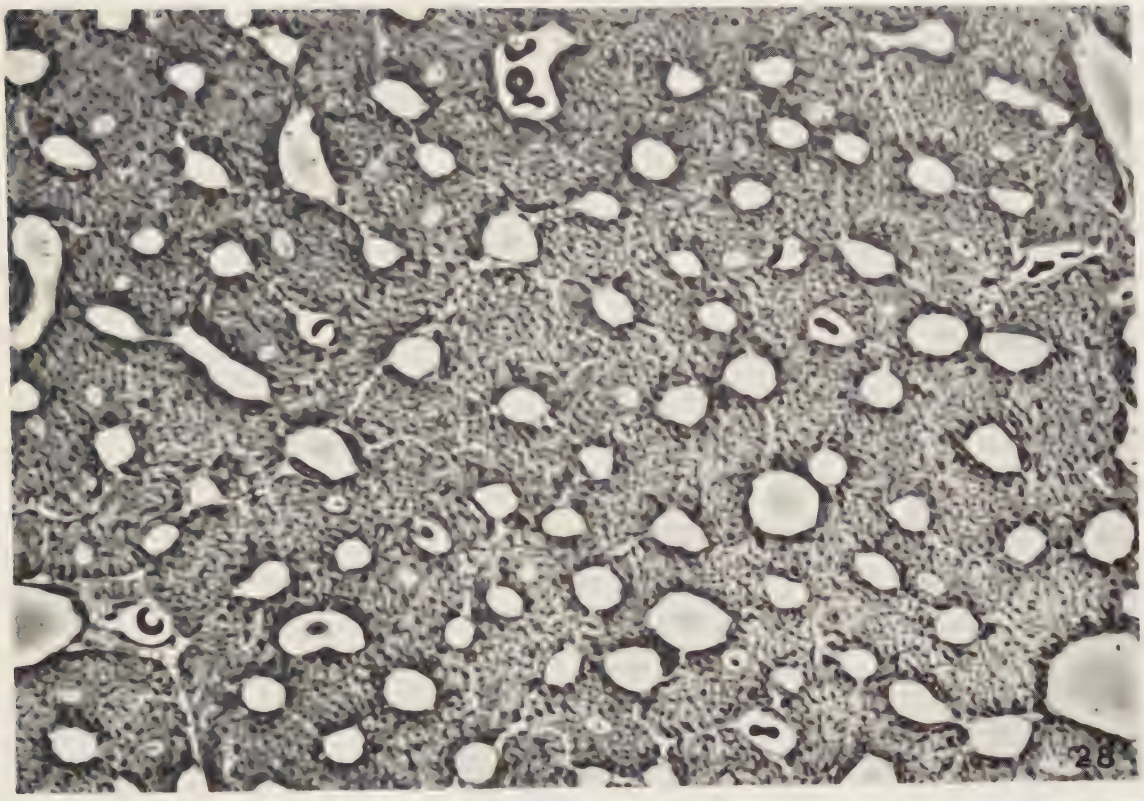
m
g
25

Planches 26 et 27. - Coupes transversales de myocarde normal (planche 26) et de myocarde hypoxique (30 jours) : à noter, la plus grande densité de capillaires du coeur hypoxique. Grossissement identique pour les deux planches : x 6 500.


N
N
cap
26


N
cap
27

Planches 28 et 29.- Coupes transversales de myocarde normal (planche 28) et de myocarde hypoxique (30 jours) en contraste de phase : à noter, la plus grande densité de capillaires du coeur hypoxique. Grossissement identique pour les deux planches : x 600. (Matériel ayant servi pour l'analyse morphométrique de la vascularisation du myocarde).


28

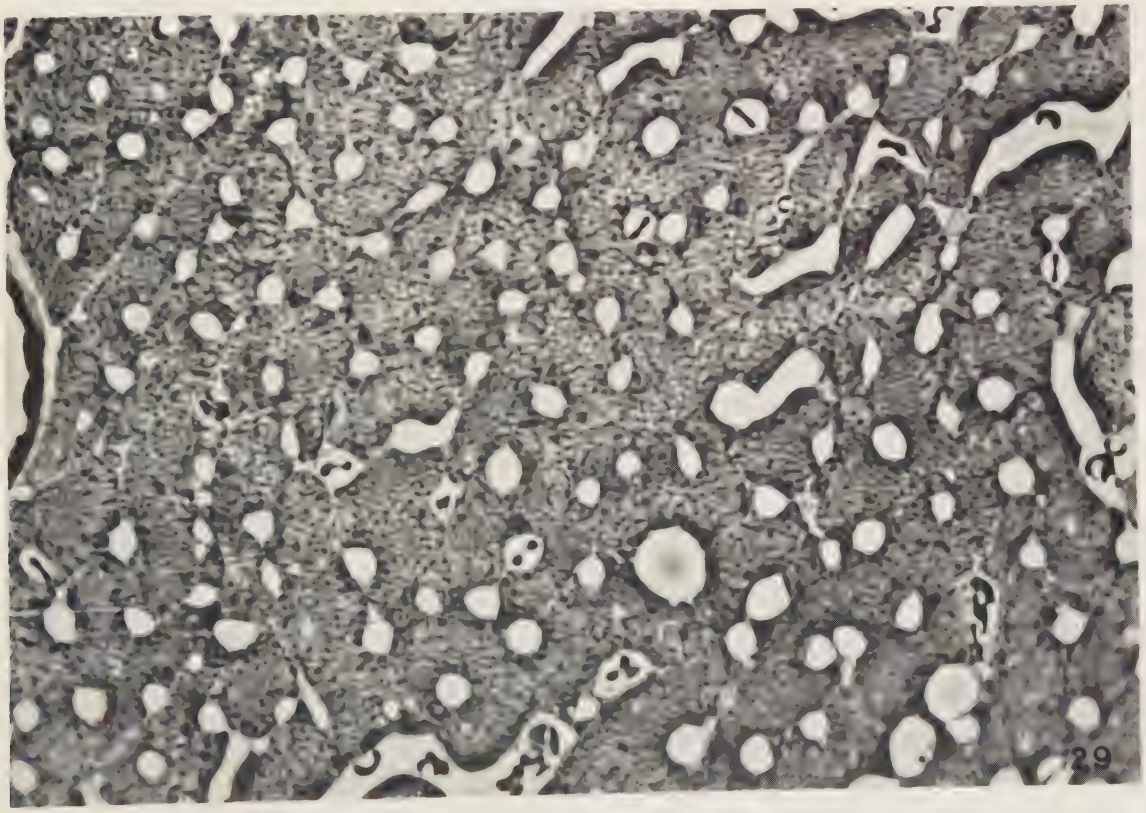

29

TABLEAU 2

ANALYSE MORPHOMETRIQUE DU MYOCARDE VENTRICULAIRE CHEZ LE RAT APRES HYPOXIE CHRONIQUE ; ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE ET MICROSCOPE A CONTRASTE DE PHASE.

	Volumes relatifs occupés par mitochondries	Volumes relatifs occupés par myofibrilles	Rapport mitochondries/ myofibrilles	Nombre mitochondries/ $100/u^2$	Nombre capillaires / mm^2
TEMOINS	36,00 ± 0,66	64,00 ± 0,69	0,52 ± 0,015	53,83 ± 1,02	3500 ± 64
HYPOXIE 10 j	39,40 ± 0,90	60,60 ± 0,88	0,65 ± 0,022**	55,97 ± 1,09	3980 ± 105 *
HYPOXIE 30j	36,50 ± 0,62	63,50 ± 0,52	0,59 ± 0,010*	59,29 ± 1,16**	4790 ± 51 **

8-12 animaux par groupe, 10 photos par rat, $\bar{m} \pm SE$, * $p < 0,01$, ** $p \leq 0,001$

crêtes et un gonflement de l'espace interne, étaient des signes certains d'hypoxie myocardique (BISCHOFF, 9; HAUSAMEN, 109 ; SULKIN, 321).

Les mêmes lésions ont été cependant retrouvées dans d'autres conditions, dans lesquelles un manque d'oxygène n'est pas prouvé (cobalt disease, certaines avitaminoses, insuffisance cardiaque expérimentale, etc...). Des lésions similaires ont été décrites également au cours de l'autolyse post mortem (NICOLAS, 223) et après une fixation lente (HATT et MORAVEC, 107). Il semble donc que le gonflement des mitochondries reflète beaucoup plus fidèlement les troubles électrolytiques secondaires à une carence énergétique des cellules cardiaques, quelle que soit son origine précise. La ressemblance d'un gonflement "osmotique" (BRIERLEY, 116, 117) et "mécanochimique" (HACKENBROCK, 95, 96) des mitochondries isolées plaide dans ce sens.

. L'augmentation de la densité des capillaires a déjà été décrite au cours d'une hypoxie chronique (BACKER, 8 ; VALDIVIA, 323 ; POUPA, 257) et a été interprétée comme un mécanisme compensateur de la mauvaise oxygénation du myocarde.

A première vue elle semble être contradictoire avec les résultats de MORET (212), qui a trouvé chez l'homme au cours de l'adaptation à haute altitude une diminution du débit coronaire. Elle est plus compréhensible quand on rappelle que dans nos expériences la pression de perfusion intracoronaire du glutaraldéhyde était de 150-180 mmHg. Le résultat de notre analyse morphométrique reflète vraisemblablement la capacité "tota-

le" du lit vasculaire dont une partie seulement est ouverte au repos - lit vasculaire "fonctionnel" (RAKUSAN,266). Les autres coronaires ne s'ouvrent qu'au cours d'un effort (WACHTLOVA, 334).

. La diminution de la taille moyenne des mitochondries suggérée par les résultats de l'analyse morphométrique, confirme les résultats de OU (234) qui comptait les mitochondries dans l'homogénat du myocarde normal et hypoxique.

Cette modification pourrait avoir une signification fonctionnelle considérable : amélioration du rendement de la fabrication mitochondriale d'ATP et maintien de sa production au niveau normal, malgré une oxygénation insuffisante (OU, 234 ; REYNAFARJE, 277).

Si on accepte le mécanisme chemiosmotique de l'oxydation phosphorylante selon lequel la diminution du gradient transmembranaire de (H^+) serait responsable de la synthèse d'ATP (MITCHELL et MOYLE, 193), plus petites seront les mitochondries, plus la production d'ATP sera aisée. Le même $pH_{i.m.}$ sera atteint, dans ces conditions, avec moins de protons transportés au travers de la membrane interne (LEHNINGER, 166 ; MITCHELL, 194). Par conséquent, la même quantité d'ATP pourrait être produite en présence d'une respiration ralentie comme on le voit au cours d'une hypoxie.

3. Etude simultanée de l'état métabolique et de l'ultrastructure mitochondriale du coeur isolé perfusé.

En utilisant la préparation du coeur isolé nous

avons fait une tentative pour comparer plus systématiquement l'ultrastructure et l'activité respiratoire des mitochondries cardiaques in situ.

- a) Matériel et méthodes

Les coeurs isolés de lapin ont été perfusés selon Langendorff pendant 15 min., sous une pression de 50 mmHg. Leur activité métabolique a été ensuite modifiée par anoxie et par des drogues agissant au niveau de la chaine respiratoire (dinitrophénol, oligomycine, antimycine A, isoprotérénol), ou par un surmenage mécanique (insertion d'un ballonnet dans le ventricule gauche). La consommation d'oxygène (MVO_2) et les performances mécaniques (pression intraventriculaire, sa dérivée première, fréquence cardiaque) ont été contrôlées au cours de l'expérience, dont la durée totale était de 30 min.; quelques perfusions anoxiques de 30 et de 60 min. ont été également faites. A la fin de l'expérience, les coeurs ont été arrêtés en diastole et fixés par le glutaraldéhyde (30 coeurs). Un autre groupe (44 coeurs) a été utilisé pour l'analyse biochimique des composés riches en énergie.

- b) Résultats

Consommation d'oxygène, performance mécanique : L'activité mécanique des coeurs témoins est restée en général stable pendant au moins 45 min. La pression ventriculaire a été en moyenne de 80 mmHg, le dp/dt de 600 mmHg/sec. La consommation d'oxygène (MVO_2) a été de 8 µmoles/gdw, elle a doublé après l'insertion du ballonnet dans le ventricule gauche (tableau 3). L'isoprotérénol et le dinitrophénol ont augmenté encore la MVO_2, l'un par son action sur le turnover cellulaire de

TABLEAU 3

TAUX TISSULAIRES DES COMPOSES "RICHES EN ENERGIE" ET CONSOMMATION D'OXYGENE DES COEURS ISOLES DE LAPIN AU COURS DE DIFFERENTS ETATS METABOLIQUES.

	CP	ATP	ADP	Pi	$\frac{ATP}{ADP + Pi}$	MVO_2
CONTROLES (7)	38,62 ± 5,72	20,01 ± 3,00	2,41 ± 0,72	16,08 ± 3,33	1,05 ± 0,18	8,35 ± 3,21
COEURS ISOVOLEMIQUES (11)	26,43 ± 3,95	14,10 ± 1,86	1,47 ± 0,07	10,54 ± 1,54	1,15 ± 0,03	16,58 ± 2,94
ISOPROTERENOL (7)	28,21 ± 2,09	13,09 ± 2,32	1,70 ± 0,40	14,80 ± 0,38	0,81 ± 0,14	26,81 ± 3,87*
ANTIMYCINE A (7)	6,35 ± 1,55*	10,69 ± 2,86	1,42 ± 0,54	21,85 ± 2,70*	0,45 ± 0,14	6,66 ± 3,10*
DINITROPHENOL (9)	11,12 ± 1,70*	10,38 ± 2,32	1,78 ± 0,14	23,79 ± 6,20	0,39 ± 0,08*	29,84 ± 1,47*
OLIGOMYCINE (8)	5,10 ± 0,62	5,69 ± 1,22	0,77 ± 0,12	31,38 ± 5,60	0,27 ± 0,06	7,27 ± 4,30

/umoles/gdw, /umoles O_2/gdw/min, * $p < 0,005$

l'ADP, l'autre par son effet découplant. L'addition d'antimycine A (bloc de la chaine respiratoire) et d'oligomycine (bloc de la phosphorylation d'ADP) a entrainé par contre une inhibition significative de la consommation d'oxygène (tableau 3). Au cours de l'anoxie (95 % O_2, 5 % CO_2) la MVO_2 est resté inférieure à un taux mesurable.

Les performances mécaniques ont été dans toutes ces conditions grossièrement perturbées. Une diminution progressive de la pression ventriculaire et du dp/dt a toujours été présente au cours d'une anoxie aiguë et après l'administration des inhibiteurs métaboliques. Seul l'isoprotérénol provoquait, à la dose employée, une période transitoire d'hypercontractilité (pression ventriculaire de 120-130 mmHg, dp/dt de 1200 mmHg/sec.). Au bout de 15-20 min. apparaissent également des troubles contractiles (extrasystoles, rythme irrégulier) suivis par une défaillance grave. Les coeurs que nous avons utilisés dans cette expérience ont été cependant fixés au moment de leur performance maximum c'est à dire au bout de 5 min. d'isoprotérénol.

. Analyse biochimique des composés riches en énergie (tableau 3) : le contenu en composés riches en énergie des coeurs de contrôle témoigne d'un bon état métabolique général, les taux du CP et d'adénine nucléotides sont similaires aux valeurs retrouvées in vivo (GUDBJARNASON, 93). Une baisse d'ATP, et surtout du CP, ainsi qu'une diminution du rapport ATP/ADP + Pi ont été observées dans toutes les conditions étudiées. Les modifications des autres métabolites n'ont pas été significatives. L'ensemble des données biochimiques

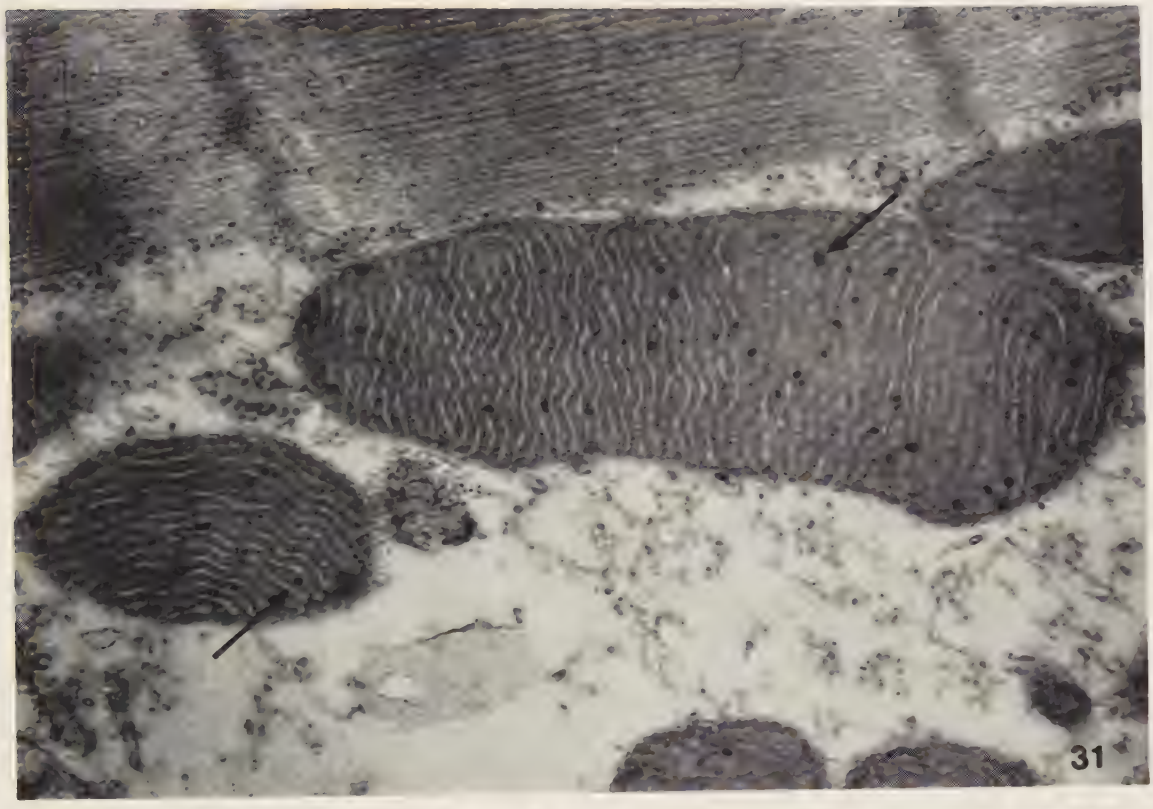
Planche 30. - Aspect ultrastructural du myocarde ventriculaire d'un coeur isolé de lapin, perfusé pendant 30 minutes avec un KREBS-HENSELEIT contenant 20 mmoles de bicarbonate et 10 mmoles de Glucose/litre, pH final 7,4, pO_2 640 mmHg. Fixateur : 2,3 % de Glutaraldéhyde dans un tampon Cacodylate de Na 75 mM, pression de perfusion 150 mmHg. A noter l'aspect dense des mitochondries (m) abondance du glycogène (g) et quelques gouttelettes lipidiques (Tg). Une légère dilatation des tubes T (T) est à remarquer ; x 14 500.

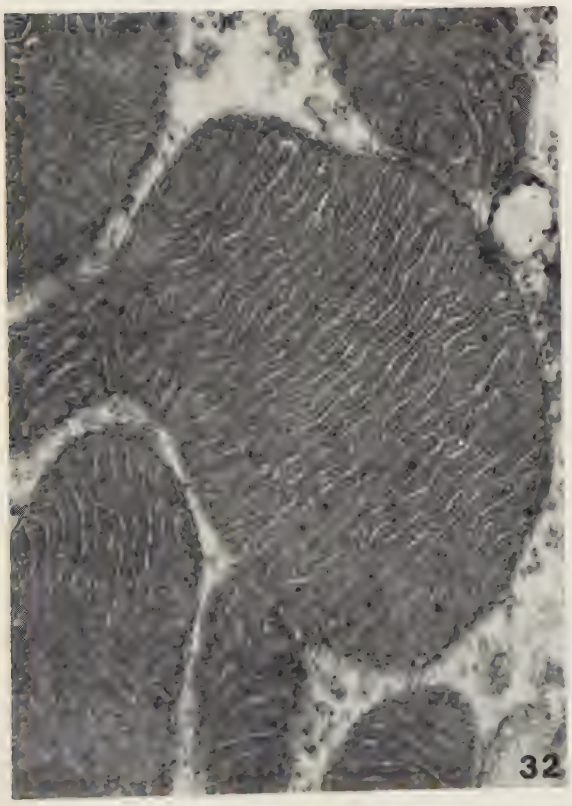
Tg
m
g
Z
Tg
A
T
30

Planche 31. - Détail d'une mitochondrie d'un coeur témoin. La matrice est dense, contenant de nombreux grains intracristam (↗), les crêtes sont régulières ; x 40 000.

Planche 32. - Détail d'une mitochondrie d'un coeur traité par le dinitrophénol (35 µM/l). A part la disparition des grains intracristam, l'ultrasturcture des mitochondries est quasiment normale ; x 47 000.

Planche 33. - Détail d'une mitochondrie d'un coeur traité par l'oligomycine (1,5 mg/l). Même aspect que précédemment ; x 55 000.


31


32

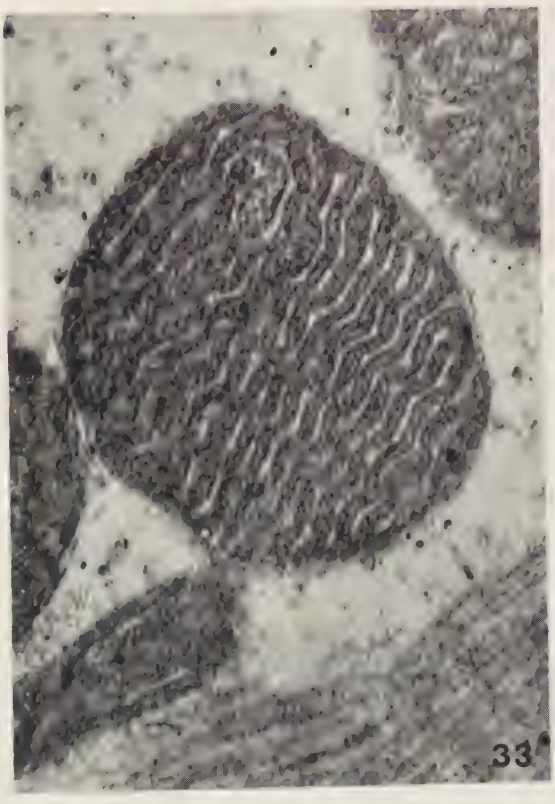
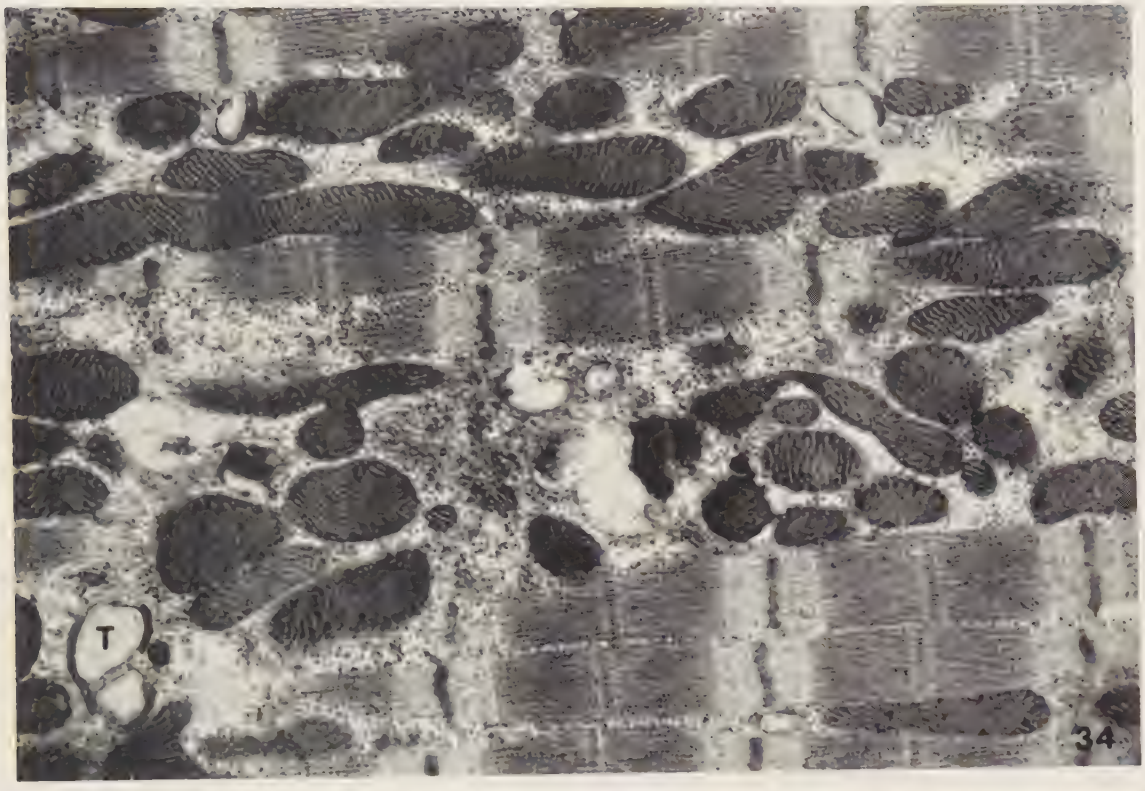
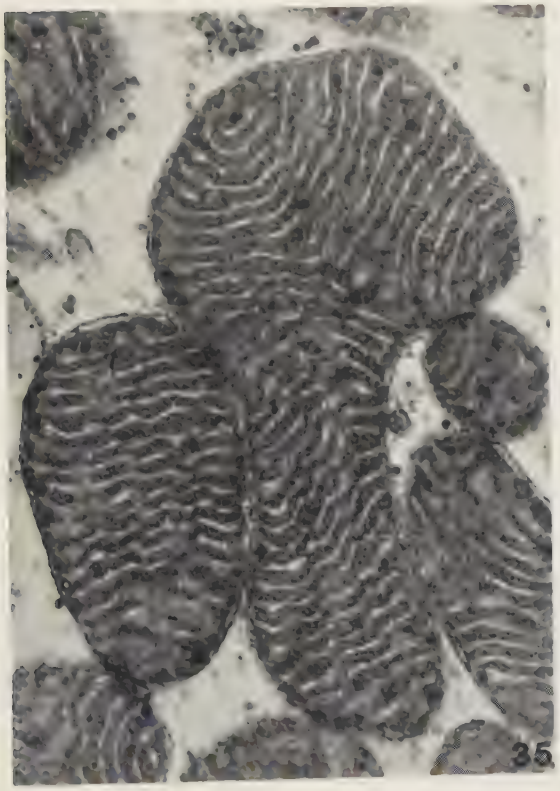

33

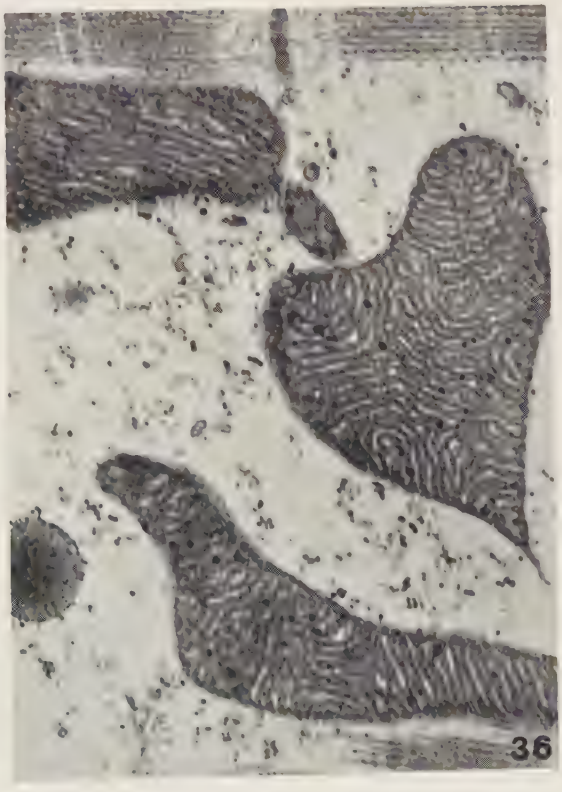
Planche 34. - Aspect ultrastructural d'un coeur isolé après perfusion anoxique (95 % N_2 + 5 % CO_2) de 30 minutes : à noter la déplétion en glycogène (g), oedème du système T (T) ; les mitochondries restent comparables à celles des témoins ; x 14 500.

Planche 35. - Détail d'une mitochondrie d'un coeur isolé de lapin, perfusé en présence d'antimycine A (2,5 µg/ml) : disparition des grains intracristam ; x 45 000.

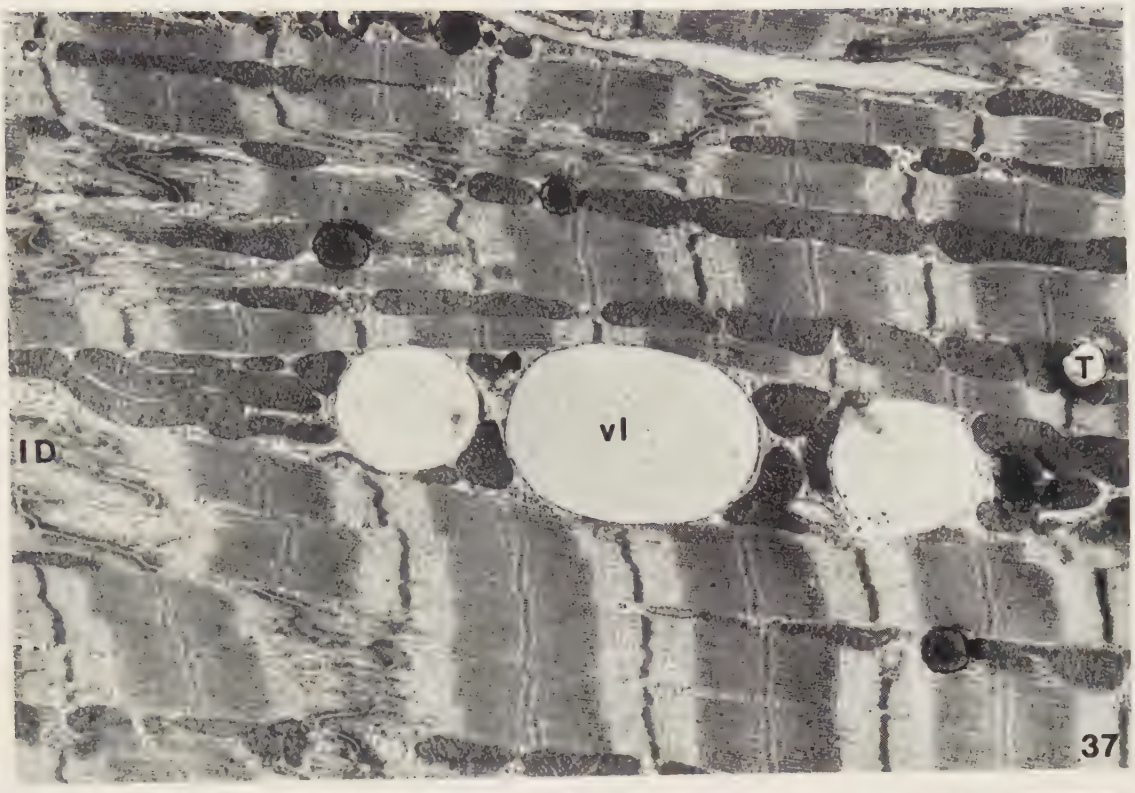
Planche 36. - Détail d'une mitochondrie d'un coeur isolé de lapin, perfusé pendant 15 min en présence d'Isoprotérénol à raison de 3 µg/min : existence d'un oedème intracellulaire, ultrastructure des mitochondries subnormale ; x 20 000.


T
34


35


36

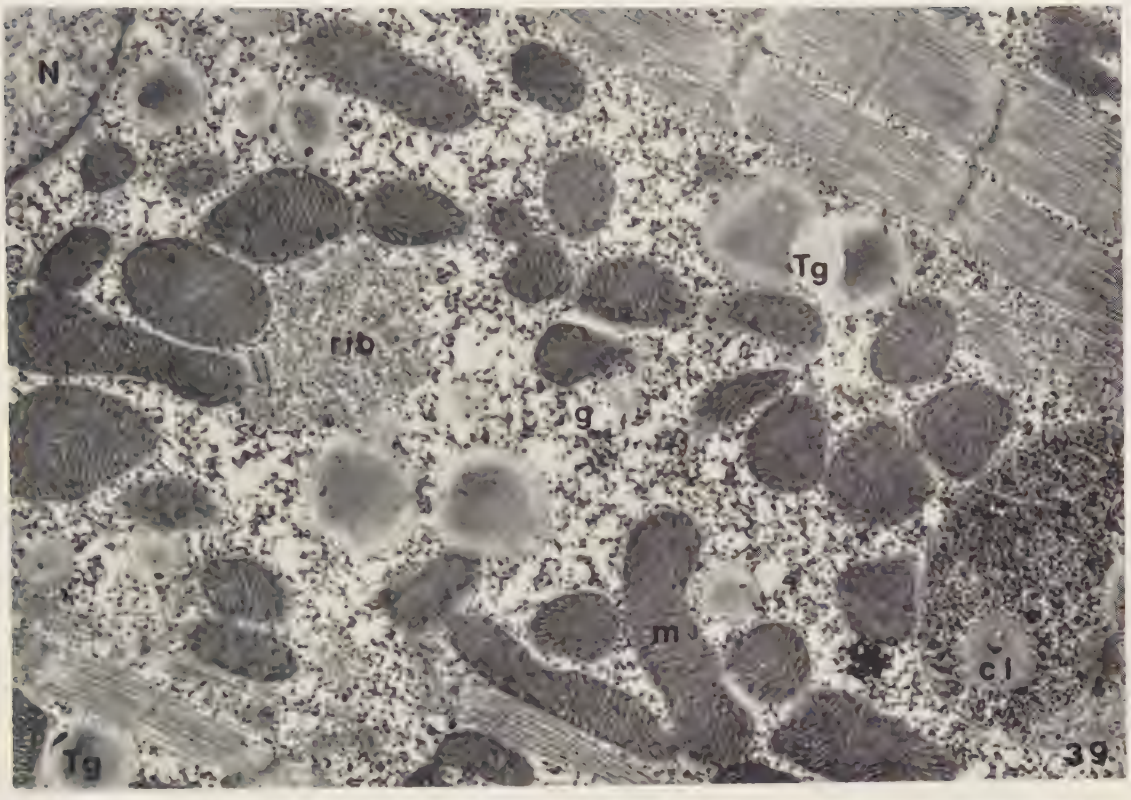
Planches 37 et 38. - Apparition d'un oedème intracellulaire (vl) après perfusion de 30 min. d'un coeur isolé de lapin en présence de 35 µM/l de dinitrophénol ;
x 15 000 et x 12 000 respectivement.

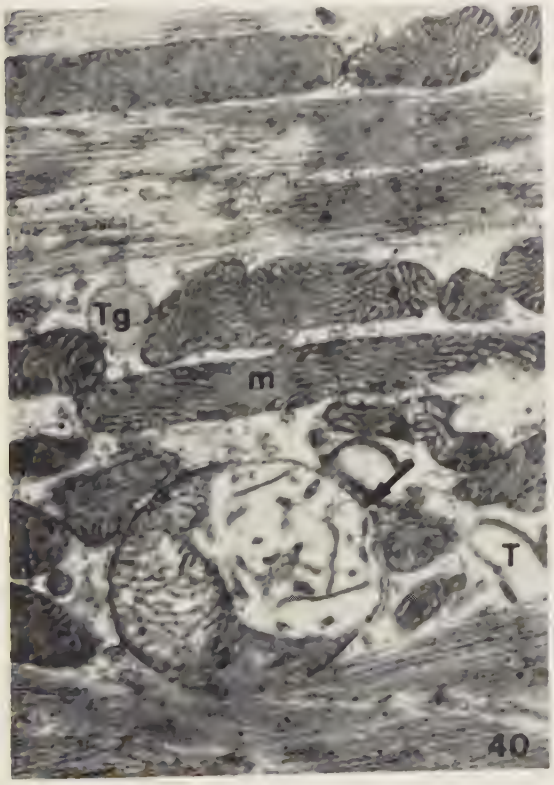

T
vl
ID
37

vl
38

Planche 39. - Aspect ultrastructural d'un coeur isolé, arrêté par perfusion d'un KREBS-HENSELEIT contenant 16 mM de ClK : accumulation de Triglycérides (Tg), de glycogène (g). La structure des mitochondries ressemble à celle des témoins. Des signes d'une activation de la protéosynthèse (rib) et un cytolysosome (cl) peuvent être remarqués ; x 14 000.

Planches 40 et 41. - Images d'une myolyse rencontrées après 30 minutes de perfusion d'Isoprotérénol 30 µg/min. Ultrastructure des mitochondries subnormales ; x 14 000 et 9 000 respectivement.


N
Tg
rib
g
m
cl
Tg
39


Tg
m
T
40

confirme l'efficacité des drogues utilisées, et témoigne des troubles énergétiques liés aux modifications des fonctions mitochondriales.

. Ultrastructure des mitochondries :
L'aspect ultrastructural du myocarde de contrôle montre les détails précédemment décrits (Planche 30). Les mitochondries (Planche 31) conservent leur aspect classique (SJÖSTRAND, 303 ; PALADE, 241), caractérisé par les crêtes régulières et une matrice riche en protéines contenant de nombreux grains opaques aux électrons (Planche 31).

Après le traitement par les inhibiteurs métaboliques employés, l'ultrastructure des mitochondries reste pratiquement normale, malgré les modifications fonctionnelles significatives. Elle est quasiment identique au cours de situations aussi diverses que le découplage (Planche 32), l'inhibition d'oxydation phosphorylante (Planche 33), l'anoxie prolongée (Planche 34) ou le blockage de la chaine respiratoire (Planche 35). Elle reste quasi normale au cours d'un surmenage mécanique (coeurs isovolémiques) ou pharmacologique (Planche 36). La disparition des grains intramitochondriaux était le seul témoin de souffrance cellulaire.

Quant aux autres structures, les lésions suivantes ont été rencontrées : oedème intracellulaire (Planches 37, 38), myolyse parcellaire, localisée au niveau des bandes I (Planche 41), accumulation des triglycérides et apparition des cytolysosomes (Planche 39).

Quelques lésions mitochondriales ont été observées dans les cellules les plus endommagées après une perfusion prolongée d'isoprotérénol, conduisant à

une défaillance contractile. Dans une même cellule les mitochondries subnormales voisinaient avec une ou deux mitochondries très endommagées (Planche 40).

- c) Discussion

Le mode d'action des inhibiteurs employés est relativement bien établi in vitro, sur les mitochondries isolées (LEHNINGER, 166 ; PULLMAN, 260). Les modifications de la MVO_2 et de l'adénylate charge de nos coeurs isolés (Figure 15) prouvent que ces drogues pénètrent au travers de la membrane plasmique et sont efficaces également sur l'organe entier.

La stabilité de l'aspect ultrastructural des mitochondries, soumises à des conditions fonctionnelles très différentes contraste avec tout ce qui a été dit au sujet des corrélations structure/fonctions (HACKENBROCK, 95, 97 ; GREEN, 89, 99 ; LEHNINGER, 167). Ce résultat négatif recoupe en fait les travaux de plusieurs auteurs (GRAHAM, 85 ; WEBER, 336 ; STONER, 319 bis ; POCHE, 254, 255 ; SCHWARTZ, 314) qui, en reprenant le travail de HACKENBROCK concernant une "activité mécanochimique" des mitochondries isolées, sont arrivés aux conclusions suivantes :

. Choix du fixateur : l'aspect ultrastructural des mitochondries, ainsi que leur activité "mécanochimique" (HACKENBROCK, 95) dépendent du fixateur employé (STONER, 319). Tandis que les mitochondries fixées par le glutaraldéhyde peuvent changer de volume au cours des chocs osmotiques et après l'addition d'ADP leur volume reste constant si on les fixe par le permanganate de potassium (BUTLER, 25).

. Non spécificité des lésions : la ressemblance du gonflement "mécanochimique" (HACKENBROCK,95, 96, 97) et de l'oedème osmotique (BRIERLEY, 116, STONER,319) est flagrante, surtout si on rappelle que la respiration et l'oxydation phosphorylante sont toujours accompagnées par des échanges ioniques entre les mitochondires et le milieu d'incubation (MITCHELL, 194 ; COCKRELL, 54 ; CHANCE, 42).

. Fixation d'adénine nucléotides sur la membrane interne : Les transitions conformationnelles, tout à fait comparables à celles décrites par HACKENBROCK peuvent être observées également en absence de la respiration (WEBER et BLAIR, 336). Après un bloc simultané de la chaine respiratoire (O°C) et de l'oxydation phosphorylante (oligomycine), l'addition d'ADP et de ses homologues entrainent régulièrement la contraction de la mambrane interne en absence de toute modification respiratoire. L'ADP reste actif également après la supression du phosphore inorganique (WEBER, 336).

. Effet inhibiteur de l'atractyloside : Toute activité "mécanochimique" disparait après le blocage de l'adényl nucléotides translocase par l'atrastyloside (WEBER, 336).

Il semble donc, que les changements conformationnels des mitochondries, comme ils ont été décrit par HACKENBROCK (95) et GREEN (89), ne peuvent pas être interprétés comme le reflet de leur état fonctionnel. Il s'agit plutôt d'une conséquence passive de la fixation d'adényl nucléotides sur les sites spécifiques de la membrane interne (336).

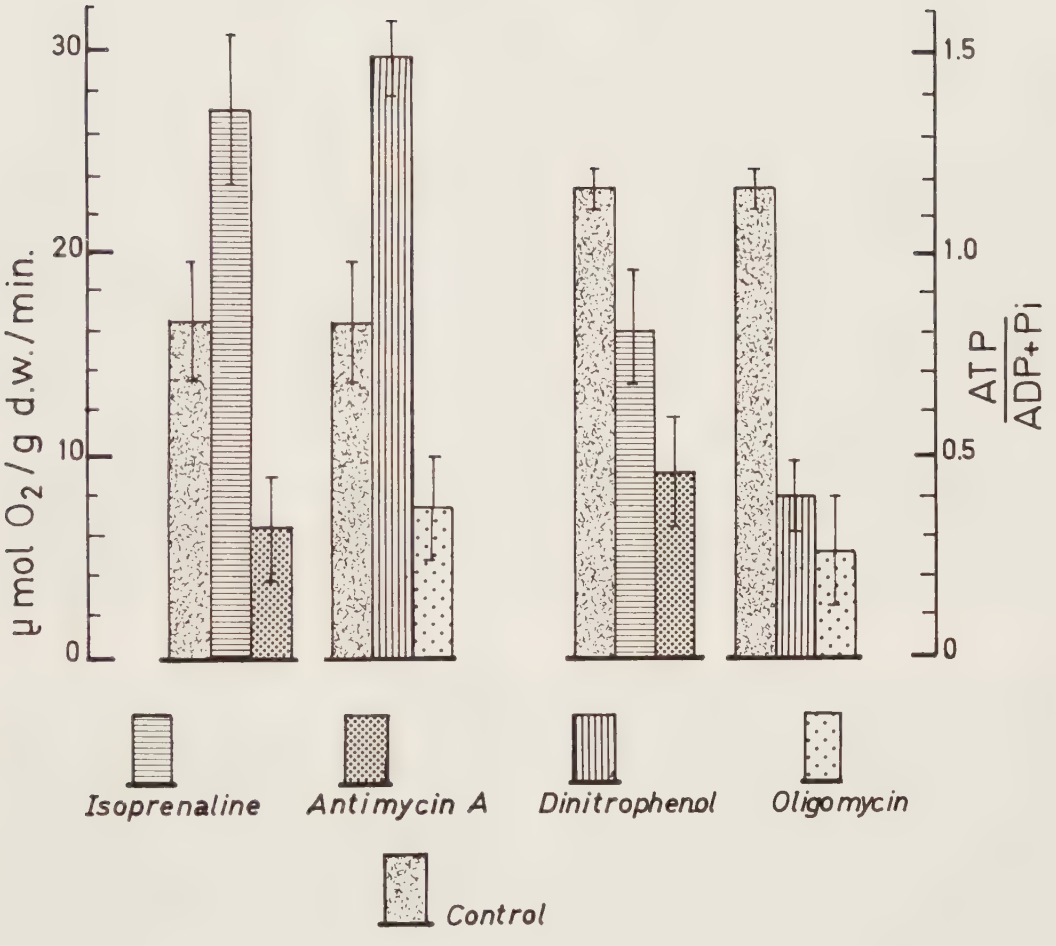
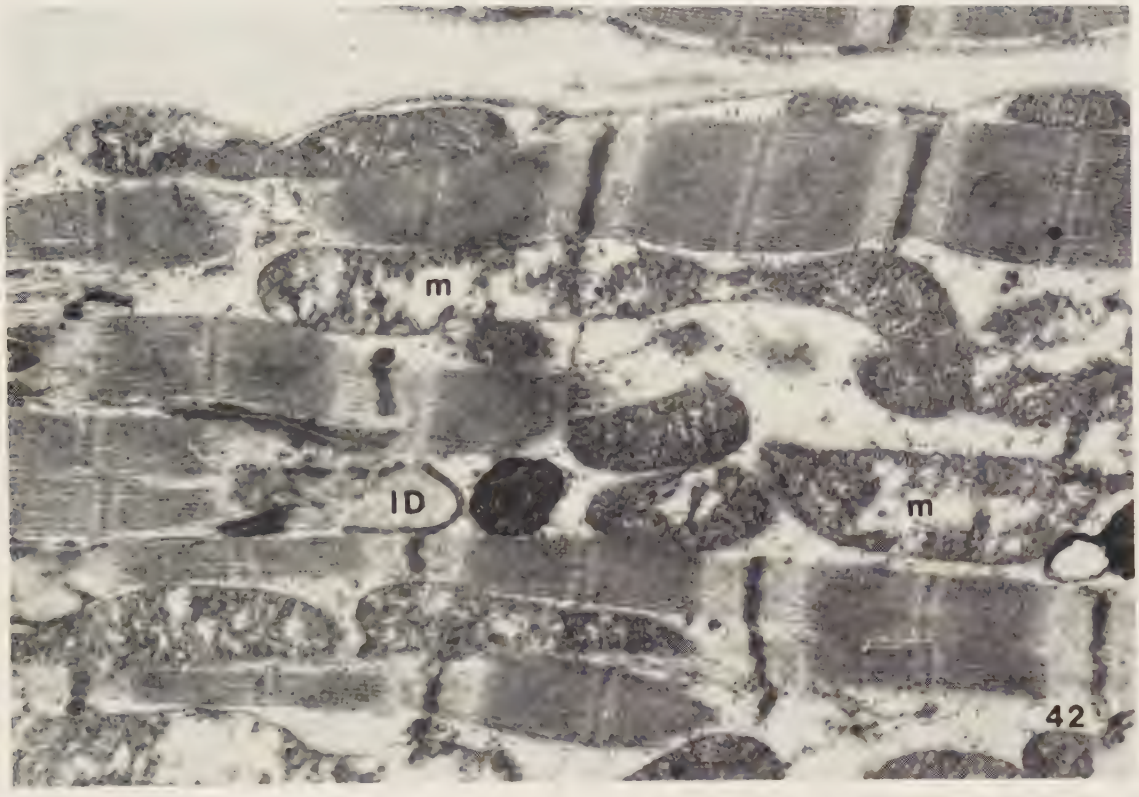
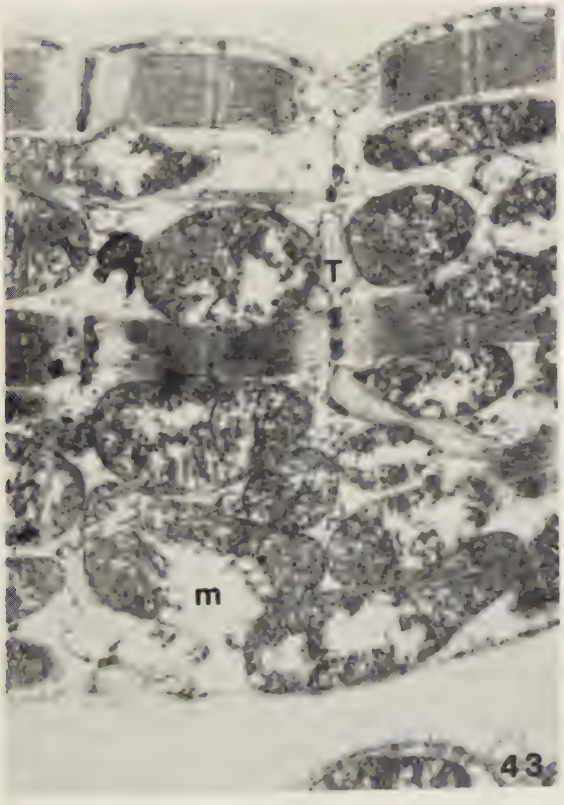


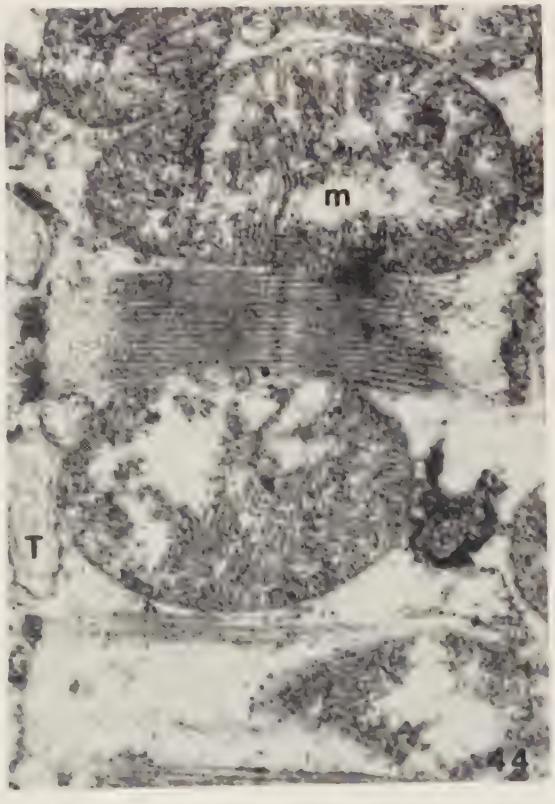
FIG. 15. CONSOMMATION D'OXYGENE ET ADENYLATE CHARGE DU COEUR ISOLE DE LAPIN APRES ADMINISTRATION DE DROGUES AGISSANT AU NIVEAU DE LA CHAINE RESPIRATOIRE.

Planche 42. - Aspect "hypoxic-like" du coeur isolé, mal fixé : après une perfusion de 30 minutes par un KREBS HENSELEIT oxygèné, le coeur a été arrêté par le chlorure de procaïne 1% et fixé 5 min plus tard ;
x 15 000.

Planches 43 et 44. - Coeur "autolytique" fixé in situ 1 heure après l'arrêt cardiaque par injection intraveineuse d'une dose massive de pentothal. A noter un oedème mitochondrial (m), le gonflement des tubes T (T) et l'éclaircissement du sarcoplasme.
x 15 000 et x 30 000 respectivement.


m
ID
m
42


T
m
43


m
T
44

In vivo, le taux intracellulaire d'ADP n'est jamais nul, surtout dans les cellules aussi actives que celles du myocarde. Il n'est pas alors très étonnant que nous n'ayons pas trouvé la moindre corrélation entre l'ultrastructure et l'état fonctionnel des mitochondries fixées in situ, qui dans la plupart des conditions examinées montraient un aspect "condensé" (HACKENBROCK, 95). L'aspect "orthodoxe", décrit en absence d'ADP exogène, et les mitochondries "hypoxic-like" décrites précedemment nous semblent être deux aspects différents d'un même processus de gonflement osmotique. Dans nos expériences, nous avons en effet observé ce gonflement mitochondrial uniquement dans les coeurs autolytiques (Planches 43, 44), siège de troubles électrolytiques importants (JENNINGS, 112).

B. II. Etude de l'activité de la chaine respiratoire du coeur intact :

Dans cette partie de notre travail nous avons essayé de contrôler l'activité de la chaine respiratoire des coeurs battants soumis à diverses épreuves fonctionnelles et pharmacologiques. Les raisons de ce protocole expérimental sont les suivantes :

(1) Comme nous venons de le voir, la microscopie électronique s'est avérée insuffisante pour une telle étude.

(2) Comme nous l'avons exposé dans l'introduction il nous a paru impossible d'extrapoler les résultats obtenus in vitro sur des mitochondries isolées aux phénomènes métaboliques in situ dans un coeur intact.

Le choix des techniques que nous avons utilisées dans ce travail se base sur un certain nombre de faits bien établis :

(1) Tout d'abord, les travaux de CHANCE et WILLIAMS (36) ont démontré une relation entre le potentiel redox des coenzymes respiratoires et la vitesse de la respiration.

(2) La difficulté de calculer le potentiel redox intramitochondrial à partir des concentrations de métabolites NAD-dépendants (KREBS, 149 ; KREBS et VEECH, 153 ; WILLIAMSON, 352) a été signalée par de nombreux biochimistes du muscle cardiaque (OPIE, 230 ; RANDLE, 271 ; WILLIAMSON, 289). Nous mêmes, n'avons pas réussi à doser l'acétoacétate, ni l'oxaloacétate dans les extraits tissulaires, car leurs taux cardiaques sont trop faibles.

(3) Le développement des techniques optiques (CHANCE, 43 ; JÖBSIS, 124 ; LÜBBERS, 179) a permis de mesurer semiquantitativement le degré de réduction des coenzymes respiratoires et de contrôler de façon continue la respiration des organes intacts (CHANCE, 45 ; CHAPMAN, 48 ; FABEL, 73 ; JÖBSIS, 123, 125).

(4) Enfin, l'existence d'une corrélation étroite décrite entre la vitesse de la respiration et le turnover du cycle de Krebs (cf. LEHNINGER, 166, 168). Une approximation des flux métaboliques instantanés au niveau des enzymes - clefs de ce dernier est devenu possible et a été exploitée dans de nombreux laboratoires (RANDLE, 271 ; NEELY, 219 ; WILLIAMSON, 289) pour étudier l'activité métabolique des mitochondries cardiaques in situ.

1. Etude des transitions respiratoires du coeur isolé par mesures de l'émission fluorescente des pyridine nucléotides

- a) Matériel et méthodes

Les coeurs de rat ont été perfusé selon LANGENDORF. L'activité mécanique, la MVO_2 ont été contrôlées au cours de l'expérience. L'émission fluorescente du NADH a été enregistrée en continu par un microfluorimètre (LEITZ MPV-1) (Fig. 13). Le choix des filtres et le système de mesure ont été déjà décrits dans les chapitres précédents.

- b) Résultats et discussion

- Modifications de l'émission fluorescente au cours d'une anoxie :

Pour vérifier si l'émission fluorescente à 480 nm reflète réellement le degré de réduction des pyridine nucléotides, nous avons remplacé, à la fin de chaque expérience, le tampon oxygéné par une solution équilibrée par 95 % de N_2 et 5 % de CO_2. La figure 16 montre une augmentation temporaire de l'émission fluorescente du NAD(P)H secondaire à une suppression brève de l'oxygène. Son amplitude, 75 % du signal initial, correspond aux valeurs habituellement retrouvées dans ce type d'expériences (76 ± 18 %, n = 25). Après réoxygénation, les conditions redox initiales sont rapidement retrouvées (Fig. 16).

- Choix du substrat exogène :

Dans les conditions de nos expériences, le signal fluorescent reflète fatalement les fluctuations du NADH/NAD global. La possibilité d'une dissociation

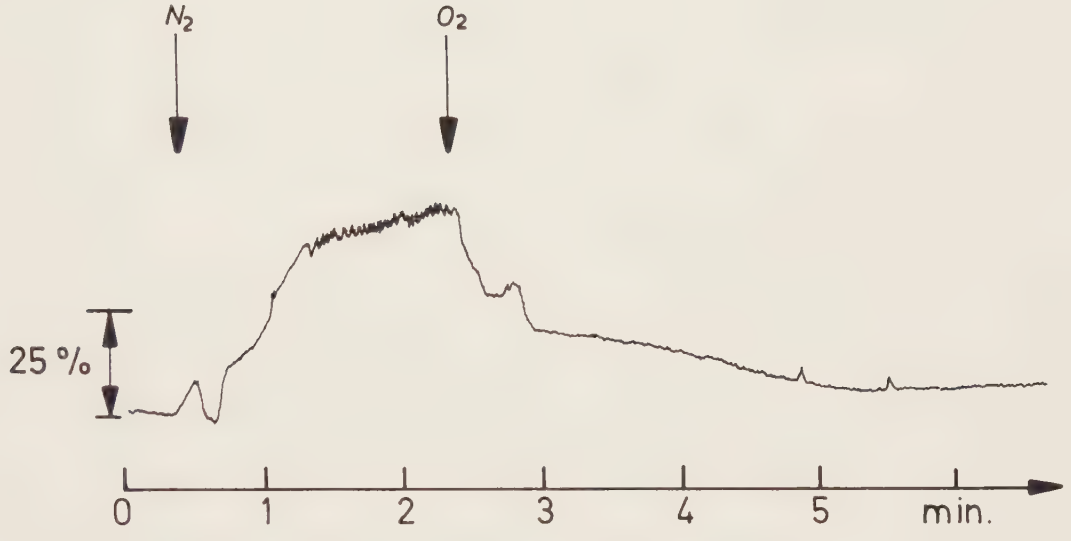


FIG. 16. EFFET D'UNE ANOXIE SUR L'EMISSION FLUORESCENTE DES PYRIDINES NUCLEOTIDES D'UN COEUR ISOLE.

HBO 100, filtre primaire 365 nm, filtre secondaire 481 nm. Rat à jeun depuis 24 heures ; d-β-OH-butyrate 2,5 mM, enregistrement fait après 15 min de perfusion à 50 mmHg.

entre les changements redox des pyridines nucléotides intramitochondriaux et cytosoliques, a été discutée par de nombreux auteurs (JÖBSIS, 48, 132 ; KREBS, 153 ; OPIE, 230 ; WILLIAMSON, 346). Pour étudier la respiration mitochondriale par des mesures de l'émission fluorescente du NADH, il convient donc de supprimer les fluctuations du NADH/NAD cytosolique liées aux variations du flux glycolytique.

C'est pour cette raison précise que certains auteurs ont travaillé sur des coeurs "empoisonnés" par l'iodoacétate (WILLIAMSON, 347), ou par de courts épisodes d'anoxie qui déplétaient les stocks intracellulaires de glycogène. Sur les coeurs ainsi traités, la contribution du pool cytosolique des pyridine nucléotides aux phénomènes observés à été considérée comme négligeable (WILLIAMSON, 346, 347).

Nous avons essayé une technique plus physiologique, afin de supprimer l'interférence du compartiment cytosolique : les animaux donneurs restaient à jeun pendant 24 heures et nous avons utilisé comme substrat le d-β - OH - butyrate 2,5 mM. Il est bien admis actuellement que le jeune (OPIE, 228) et l'emploi d'un substrat lipidique (EVANS, 72 ; SHIPP, 301 ; WILLIAMSON, 344) inhibent quasi-complètement la glycogénolyse du muscle cardiaque.

L'efficacité de cette technique a été testée sur une série de 12 coeurs isolés, auxquels nous avons injecté une petite dose d'isoprotérénol (2-3 µg), suffisante à provoquer un épisode d'hypercontractilité.

En présence de glucose 10 mM dans le perfusat (n = 10), une réponse biphasique a été régulièrement observée (Fig. 17). Après l'oxydation initiale du NAD(P)H est survenue une réduction prolongée (de 25 % du signal initial), disparaissant en même temps que l'effet inotrope positif de la drogue (c'est à dire au bout de 10 min environ). Un résultat similaire était précedemment signalé par WILLIAMSON (346, 347) qui l'interprétait comme une superposition des phénomènes métaboliques mitochondriaux (state 4 to 3 transition) et cytosoliques (activation de la glycogénolyse).

En présence de d-β-OH-butyrate 2,5 mM, nous n'avons jamais vu de réduction cytosolique du NADH. L'injection d'isoprotérénol provoquait uniquement quelques oscillations rapides du signal, suivies d'une oxydation très nette du NAD(P)H (Fig. 17 B). Nous l'assimilons en accord avec CHANCE (36) à une accélération de la chaine respiratoire. Son amplitude (23 % environ) n'a pas été significativement modifiée par la déplétion probable du glycogène, réalisée par trois courts épisodes d'anoxie (WILLIAMSON, 346, 347) (Fig. 17 C).

Dans un travail ultérieur, nous avons considéré l'emploi des animaux à jeun, et du d-β-OH-butyrate, comme une précaution suffisante pour éliminer les fluctuations du potentiel redox cytosolique. Le signal fluorescent recueilli à 480 nm et ces fluctuations ont été alors considérés comme les reflets des modifications du rapport NADH/NAD intramitochondrial, liées aux transitions fonctionnelles de la chaine respiratoire. Un autre argument vient à l'appui de cette possibilité : les données de JÖBSIS (123, 126) et CHAPMAN (48) qui préconisent que la quasitotalité des pyridine nucléotides est localisée à l'intérieur des mitochondries, et

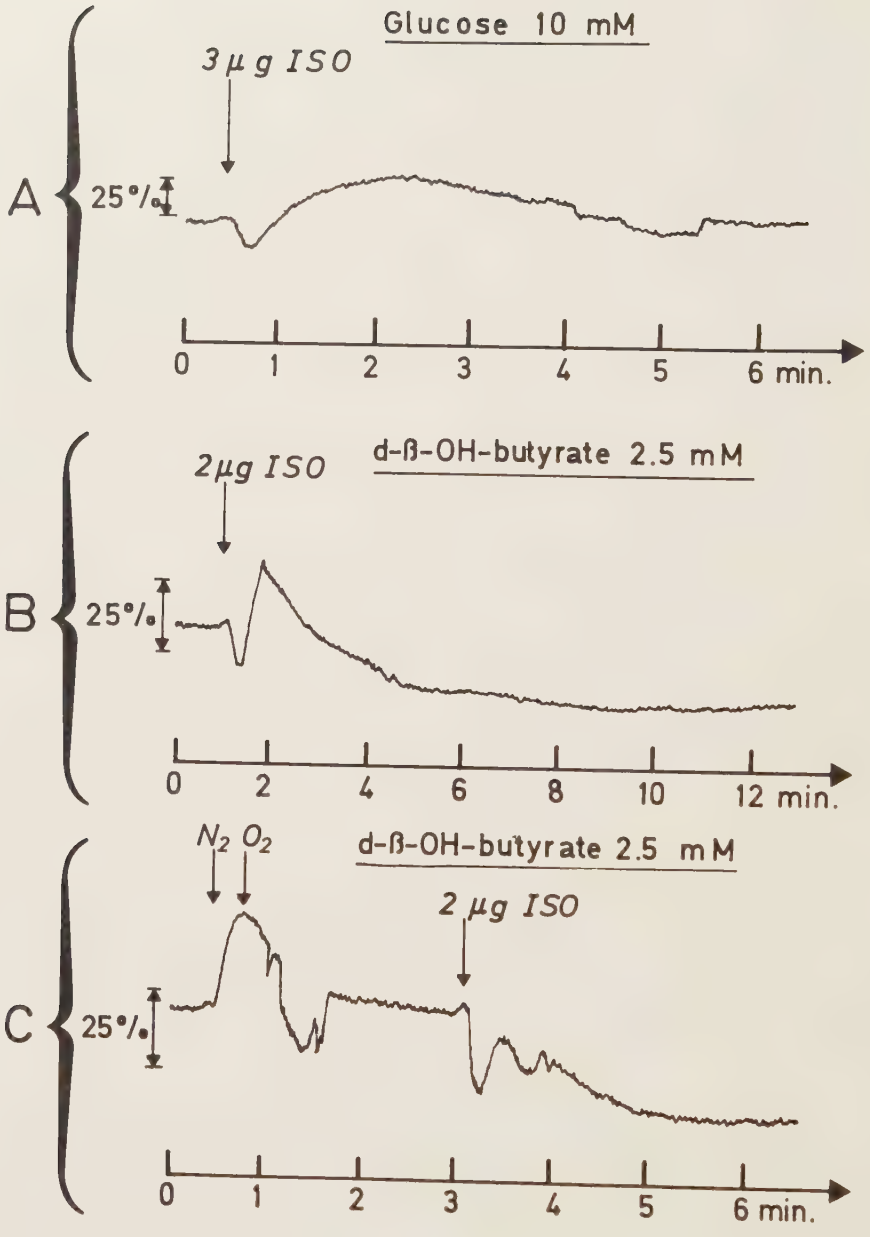


FIG. 17. EFFET D'UNE INJECTION D'ISOPROTERENOL (ISO) SUR L'EMISSION FLUORESCENTE DES PYRIDINE NUCLEOTIDES DU COEUR ISOLE. EFFET DE LA NATURE DU SUBSTRAT EXOGENE.

A - Rat nourri ad libitum, glucose 10 mM ; B, C - Rat à jeun pendant 24 heures, d-β-OH-butyrate, 2,5 mM émission initiale - 100 %.

que les fluctuations du potentiel redox du cytosol ne déterminent qu'une fraction minime du signal fluorescent.

- Effet de la pression de perfusion sur l'activité mécanique et le potentiel redox des pyridine nucléotides du coeur isolé.

Il y a au cours d'un effort cardiaque une activation du flux glycolytique (OPIE, 322 ; NEELY, 216, 219) et du cycle de KREBS (NEELY, 219 ; OPIE, 232 ; ILLINGWORTH, 117), secondaire à une accélération du turnover des adénines nucléotides (NEELY,219). La consommation d'oxygène augmente proportionnellement avec les performances mécaniques (OPIE, 229 ; NEELY,217), mais en même temps, il y a de nombreux signes de réduction intracellulaire surtout si le glucose est employé comme substrat : accumulation du lactate, augmentation du rapport lactate/pyruvate dans le tissu et dans le liquide de perfusion (OPIE, 232 ; NEELY, 216). En même temps, l'extraction d'oxygène et le débit coronaire augmentent considérablement (OPIE, 229 ; WILLIAMSON, 350).

Déjà dans les conditions basales, la possibilité d'une hypoxie des coeurs perfusés en absence d'un transporteur d'oxygène n'a jamais été écartée. A la lumière des faits qui viennent d'être rappelés, un manque d'oxygène parait encore plus probable au cours d'un effort aigu. Une étude simultanée des changements redox intramitochondriaux et cytoplasmiques serait évidemment le meilleur moyen pour résoudre cette question.

Nous avons étudié les répercussions métaboliques d'un effort cardiaque en utilisant le coeur

isolé de rat dont la pression de perfusion était brutalement augmentée (OPIE, 229 ; NEELY, 216). La relation entre la pression de perfusion et les performances mécaniques est illustrée sur la figure 18 et dans le tableau 5. Les valeurs de la consommation d'oxygène pour deux pressions extrèmes sont indiquées dans le tableau suivant (tableau 4). On peut noter dès maintenant, que les valeurs de la MVO_2 que nous avons trouvées sont, pour une pression donnée, strictement indépendantes du substrat choisi et de sa concentration. L'augmentation de la pression de perfusion de 50 à 100 mmHg entraine cependant une accélération significative de la chaine respiratoire, assurée essentiellement par l'augmentation du débit coronaire (tableau 5), dans toutes les conditions examinées (cf. tableau 4).

Sur ce même modèle nous avons étudié les modifications redox liées à l'augmentation de la contractilité. Les fluctuations du rapport NADH/NAD intramitochondrial ont été suivies par des mesures directes de l'émission fluorescente du NADH (CHANCE, 45 ; JÖBSIS, 125), le potentiel redox cytosolique a été étudié indirectement par les dosages biochimiques du lactate et du pyruvate (KREBS, 153 ; OPIE, 232). Les rapports lactate/pyruvate ont été calculés dans les extraits tissulaires et dans le liquide de perfusion.

La figure 19 montre les effets d'une modification de la pression de perfusion sur l'émission fluorescente du NADH des coeurs isolés, perfusés avec le d-β-OH-butyrate 2,5 mM. Une oxydation très nette du NADH, contemporaine d'une accélération de la chaine respiratoire, peut être remarquée sur les tracés B et C. L'état redox initial a été rapidement retrouvé après le

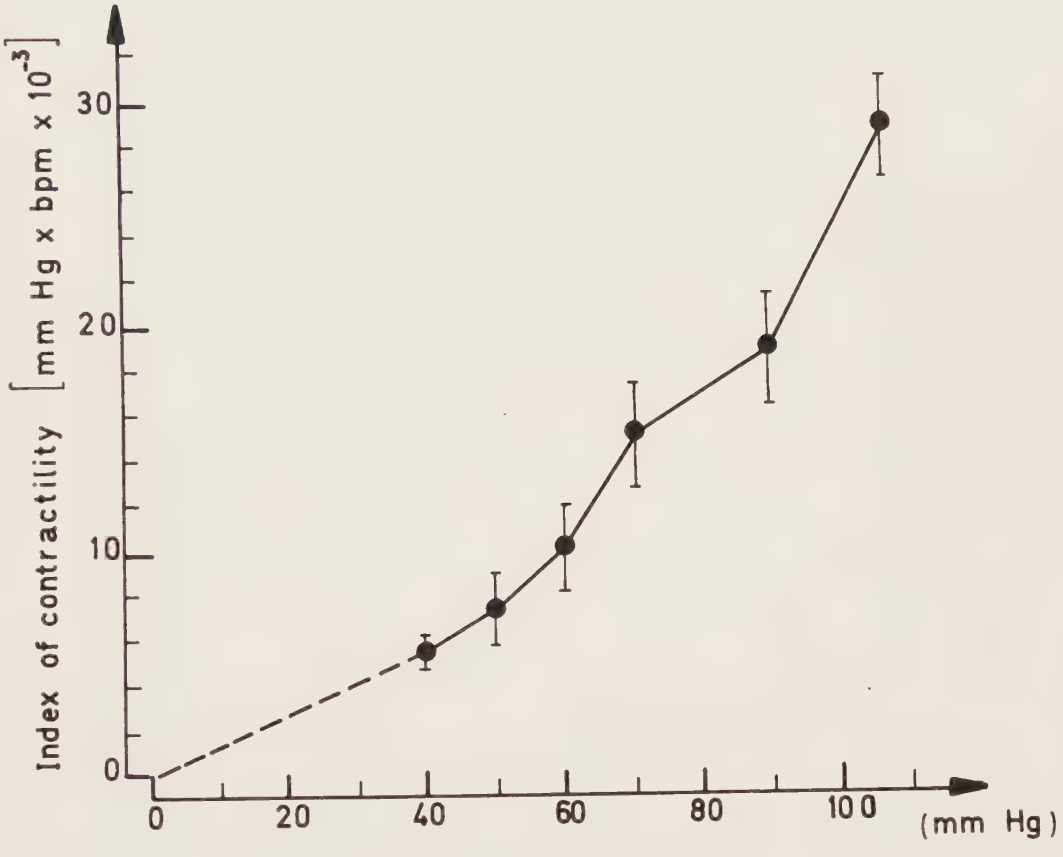


FIG. 18. EFFET DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR LES PERFORMANCES MECANIQUES DU COEUR ISOLE DE RAT (n = 9, m $\pm$ SE).

Rats à jeun pendant 24 heures, d-β-OH butyrate 2,5mM.

TABLEAU 4

EFFET DE LA PRESSION DE PERFUSION ET DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT EXOGENE SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DU COEUR DE RAT PERFUSE SELON LANGENDORFF

Pression de perfusion	Glucose (mM)			d-β-OH-butyrate (mM)		
	2,5	5,0	10,0	2,5	5,0	10,0
100 mm Hg	33 ± 0,90	32 ± 0,88	31 ± 1,29	28 ± 1,40	36 ± 1,60	36 ± 2,06
50 mm Hg	17 ± 1,24	18 ± 0,77	17 ± 0,77	19 ± 0,95	20 ± 0,96	19 ± 1,01

/umoles d'O_2 / gdw / min, n = 10, $\bar{m}$ ± SE

TABLEAU 5

RELATION ENTRE LA PRESSION DE PERFUSION, LES PERFORMANCES MECANIQUES ET L'EMISSION FLUORESCENTE (480 nm) DU COEUR ISOLE DE RAT PERFUSE SELON LANGENDORFF

Pression de perfusion (mm Hg)	LVPP (mm Hg)	CFR (ml/min)	HR (bpm)	Contractilité ($LVPP \times HR \times 10^{-3}$)	émission fluorescente (unité arbitraire)
0	-	-	-	-	176 ± 23 (25)
40	$39 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,6$	148 ± 8	$5,77 \pm 1$	100 (9)
50	$48 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,6$	155 ± 7	$7,44 \pm 2$	$93,0 \pm 0,7$ (8)
60	$57 \pm 1,0$	$7,5 \pm 0,8$	178 ± 7	$10,14 \pm 2$	$73,0 \pm 1,2$ (3)
70	$68 \pm 1,0$	$9,9 \pm 1,0$	190 ± 6	$15,12 \pm 3$	$68,1 \pm 1,9$ (9)
90	$91 \pm 2,0$	$13,8 \pm 1,5$	204 ± 8	$18,56 \pm 2$	$60,1 \pm 2,0$ (9)
110	$140 \pm 1,0$	$21,2 \pm 1,8$	213 ± 8	$29,82 \pm 3$	$55,3 \pm 2,6$ (8)

LVPP = pression systolique dans le ventricule gauche, CFR = débit coronaire, HR = fréquence cardiaque.

retour de la pression de perfusion aux valeurs initiales. Les résultats de l'analyse biochimique confirment la présence des fluctuations significatives du taux intracellulaire du NADH au cours des mêmes conditions expérimentales (tableau 6).

Dans ce même tableau on peut voir également que le taux intracellulaire du NADH, ainsi que le rapport NAD/NADH dépendent, outre la vitesse de la respiration, de la concentration du substrat exogène (source d'électrons). Pour chaque pression donnée, l'augmentation de la concentration du d-β-OH-butyrate de 2,5 à 10,0 mmoles/l entraine une réduction significative des pyridine nucléotides cellulaires. Il nous est, à l'heure actuelle, assez difficile de la situer dans un compartiment précis. Cependant la localisation strictement intramitochondriale du d-β-OH-butyrate deshydrogenase (KREBS, 153) suggère que la grande partie du NADH nouvellement créée, est liée au compartiment mitochondrial. Des résultats similaires ont été précédemment décrits par KRAUPP (147) et KREBS (153) au cours du diabète expérimental, entrainant une prédominance de l'oxydation des corps cétoniques (KREBS, 352 ; OPIE, 232).

La possibilité que les changements redox des pyridine nucléotides observés au cours de l'effort cardiaque (Fig. 19) se situent également au niveau de la chaine respiratoire, est confirmée par un certain nombre de données expérimentales (Tableau 7). Dans les conditions, au cours desquelles il y a des preuves fluorimétriques (Fig. 19) et biochimiques (tableau 6) des fluctuations redox des pyridine dinucléotides totaux, nous n'avons trouvé de changement significatif du rapport lactate/pyruvate tissulaire ni de ce-

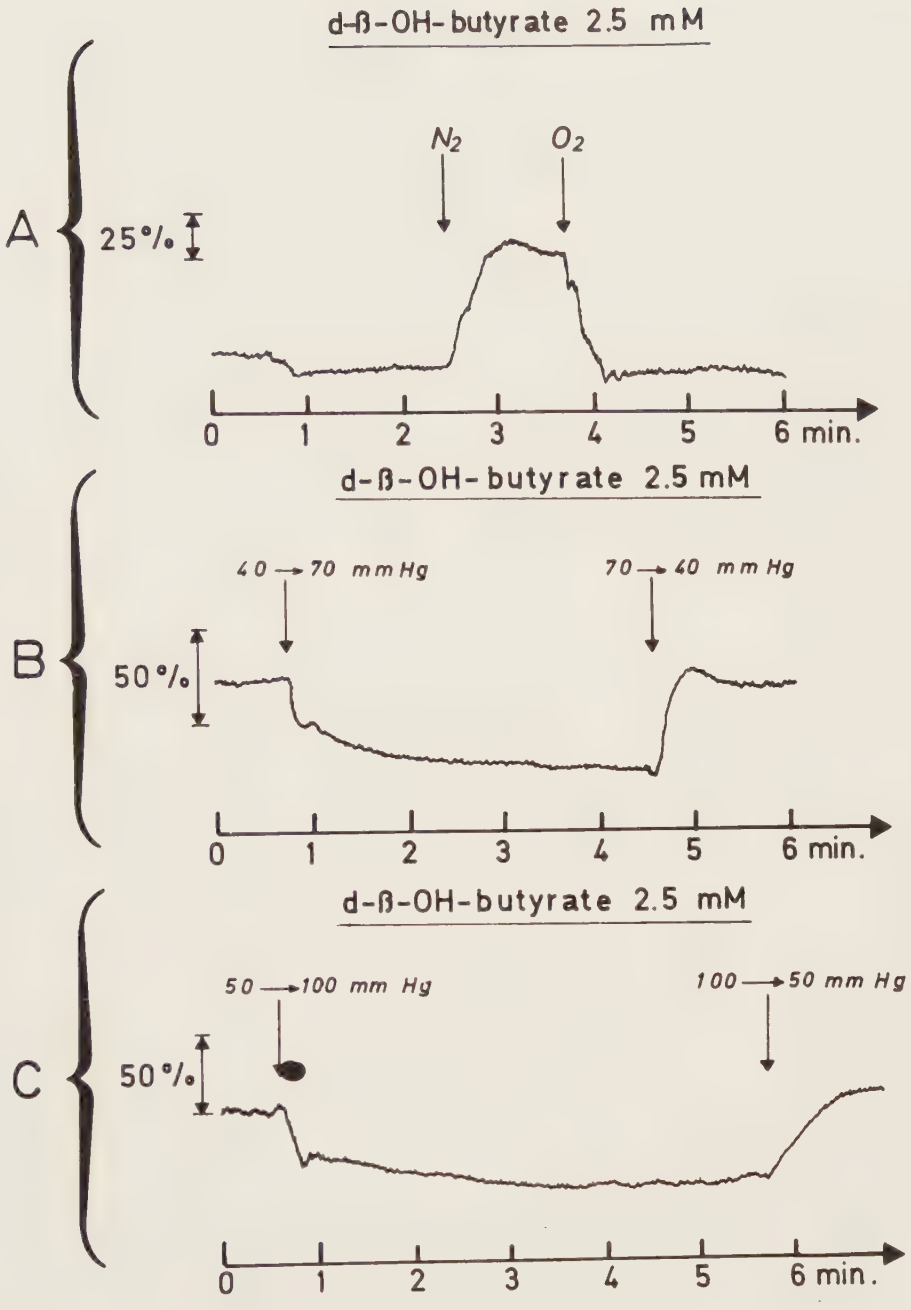


FIG. 19. EFFET D'UNE ANOXIE (A) ET D'UNE AUGMENTATION DE LA PRESSION DE PERFUSION (B, C) SUR L'EMISSION FLUORESCENTE DES PYRIDINE NUCLEOTIDES DU COEUR ISOLE.

Rat à jeun pendant 24 heures, d-β-OH-butyrate 2,5mM, émission initiale - 100 %.

TABLEAU 6

EFFET DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR LE POTENTIEL REDOX DES PYRIDINE NUCLEOTIDES DU COEUR DE RAT PERFUSE AVEC DU d-β-OH BUTYRATE

Pression de perfusion	d-β-OH-butyrate 2,5 mM			d-β-OH-butyrate 10 mM		
	NADH	NAD^+	$\frac{NAD^+}{NADH}$	NADH	NAD^+	$\frac{NAD^+}{NADH}$
100 mm Hg	197 ± 6	4175 ± 75	21,2 ± 0,4	313 ± 17	4145 ± 50	13,4 ± 0,6
50 mm Hg	340 ± 18**	4535 ± 40*	13,5 ± 0,7**	535 ± 28**	4245 ± 75	8,0 ± 0,4**

nmoles/gdw, $\bar{m} \pm SM$, $n \leqslant 8$, $*p < 0,05$, $** p < 0,001$

lui du milieu de perfusion. Dans ces expérience le degré de réduction du cytosol ne semble pas être touché par des modifications de la vitesse de la respiration (tableau 7). Ce résultat suggère que le signal fluorimétrique (Fig. 19) est surtout d'origine mitochondriale et que dans les conditions de nos expériences, l'oxygénation du coeur reste relativement bonne, malgré un contenu en oxygène faible (2 vol %) du milieu de perfusion. Les réserves fonctionnelles importantes du lit coronaire (RUSHMER, 286) et les performances ventriculaires basses (NEELY, 216) favorisent le maintien des conditions redox physiologiques.

Il nous semble donc qu'on peut, dans une certaine mesure, affirmer l'utilité de la fluorimétrie épicardique à l'étude de la chaine respiratoire des organes intacts (CHANCE, 37 , 45 ; JÖBSIS, 123, 125 ; LÜBBERS, 73, 181). Un certain nombre de précautions doit cependant être respecté.

A part le choix du substrat exogène, sa concentration dans le milieu de perfusion nous parait importante. Nous avons déjà vu dans le tableau 6, que le taux tissulaire du NADH, ainsi que le rapport NADH/NAD augmentent significativement avec la concentration du d-β-OH-butyrate. Une réduction cellulaire moins importante (rapport lactate/pyruvate du milieu de perfusion) a été également observée au cours des perfusions sans substrat (tableau 7 et 8). Des résultats similaires ont été signalés par SAFER (289) et s'accordent bien avec les travaux de CHANCE et WILLIAMS concernant les états respiratoires des mitochondries isolées (36) (Fig. 9).

Les résultats que nous avons obtenus,

TABLEAU 7

EFFET D'UNE AUGMENTATION SOUDAINE DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR LE RAPPORT LACTATE/PYRUVATE DU PERFUSAT ET SUR LA PRODUCTION DU LACTATE PAR LE COEUR ISOLE DE RAT. *

TEMPS (min)	PRESSION DE PERFUSION (mm Hg)	PERFUSAT AVEC d- -OH BUTYRATE (2,5 mM) Lactate/Pyruvate Perfusat	Production du lactate (μmole/g^{-1}ww/min^{-1})	Débit coronaire (ml/min)
5 - 5,30	40	11,2 ± 1,5 (11)	0,38 ± 0,05 (9)	8,5 ± 0,4 (8)
6 - 6,30	40	8,9 ± 1,0 (11)	0,28 ± 0,05 (9)	8,7 ± 0,4 (8)
7 - 7,30	40	9,9 ± 2,1 (11)	0,23 ± 0,04 (9)	8,5 ± 0,4 (8)
8 - 8,30	40	10,7 ± 1,6 (10)	0,17 ± 0,04 (9)	8,5 ± 0,5 (7)
9 - 9,30	40	10,3 ± 1,2 (11)	0,18 ± 0,04 (9)	8,3 ± 0,4 (8)
10 - 10,30	40	8,2 ± 1,0 (11)	0,13 ± 0,02 (9)	8,1 ± 0,4 (8)
11.15 - 11,30	70	9,1 ± 1,3 (11)	0,19 ± 0,03 (9)	14,9 ± 0,7 (8)
11.45 - 12	70	7,8 ± 1,0 (11)	0,19 ± 0,04 (9)	13,0 ± 0,6 (8)
12.15 - 12,30	70	6,3 ± 1,0 (11)	0,15 ± 0,03 (9)	13,3 ± 0,5 (8)
12.45 - 13	70	9,0 ± 1,1 (11)	0,18 ± 0,04 (9)	13,0 ± 0,6 (8)
13.15 - 13,30	70	7,8 ± 1,6 (11)	0,13 ± 0,03 (9)	13,4 ± 0,4 (8)
13.45 - 14	70	11,4 ± 1,8 (11)	0,19 ± 0,04 (9)	12,7 ± 0,6 (8)
14.15 - 14,30	70	10,3 ± 2,4 (11)	0,19 ± 0,04 (9)	13,3 ± 0,7 (8)
14.45 - 15	70	9,5 ± 1,6 (11)	0,17 ± 0,03 (9)	12,4 ± 0,7 (8)
15.15 - 15,30	70	11,8 ± 1,8 (11)	0,18 ± 0,03 (9)	12,9 ± 0,7 (8)
16				

m ± SE (n), rats à jeun 24 heures, * $p < 0,025$

* Nous remercions le Dr. L. H. OPIE d'avoir bien voulu mettre à notre disposition les résultats cités dans ce tableau (voir la référence 208).

TABLEAU 8

EFFET D'UNE AUGMENTATION SOUDAINE DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR LE RAPPORT LACTATE/PYRUVATE DU PERFUSAT (ET DU TISSU), DU COEUR ISOLE DE RAT PERFUSE SANS SUBSTRAT EXOGENE. *

TEMPS (min)	PRESSION DE PERFUSION (mm Hg)	PERFUSAT SANS SUBSTRAT Rapport Lactate / Pyruvate	
		Perfusat	Tissu
5 - 5,30	40	3,7 ± 0,40 (19)	-
6 - 6,30	40	3,3 ± 0,6 (6)	-
7 - 7,30	40	4,2 ± 0,4 (11)	-
8 - 8,30	40	3,9 ± 0,7 (11)	-
9 - 9,30	40	4,0 ± 0,5 (13)	-
10 -10,30	40	3,4 ± 0,6 (13)*	13,1 ± 3,8 (6)
11.15 -11,30	70	4,5 ± 1,0 (10)	-
11.45 -12	70	5,9 ± 0,8 (5)*	12,8 ± 3,6 (7)
12.15 -12,30	70	3,7 ± 0,6 (9)	-
12.45 -13	70	2,9 ± 0,7 (5)	-
13.15 -13,30	70	4,4 ± 0,2 (4)	-
13.45 -14	70	3,4 ± 0,9 (6)	-
14.15 -14,30	70	3,6 ± 0,6 (6)	-
14.45 -15	70	3,4 ± 0,8 (3)	-
15.15 -15,30	70	3,4 ± 0,8 (7)	-
16 -	70	-	11,5 ± 1,6 (8)

m ± SE (n), rats à jeun 24 heures, * $p < 0,025$

* Nous remercions le Dr. L. H. OPIE d'avoir bien voulu mettre à notre disposition les résultats cités dans ce tableau (voir la référence 208).

avec les coeurs perfusés en présence des différentes concentrations du glucose sont encore plus explicites. En effet, l'accélération de la chaine respiratoire provoquée par une augmentation de la pression de perfusion de 50 à 100 mmHg, s'accompagne d'une oxydation du NADH, uniquement quand une concentration faible du glucose (2,5 mM) est employée (Fig. 20 , tableau 9).

En présence du glucose 10 mM nous ne l'avons jamais observée (n = 10). Sur les enregistrements de l'émission fluorescente, une réduction transitoire du NADH est parfois apparue (Fig. 20 B). Elle peut être secondaire à une insuffisance temporaire des "hydrogen shuttles" débordés par un excès du NADH d'origine glycolytique (SAFER,287). Au cours d'un nouvel état stationnaire, la formation cytosolique du NADH restait toujours augmentée dans nos expériences avec le glucose 10 mM (cf. OPIE, 232 et NEELY, 218) pour les valeurs du rapport lactate/pyruvate), et annulait l'effet direct du travail cardiaque sur le pool mitochondrial des pyridine nucléotides (Fig. 20 B).

Ce travail peut être mis en parallèle avec les effets de l'isoprotérénol déjà décrits (Fig.17). Là aussi, une accélération de la chaine respiratoire a été mise en évidence uniquement dans des conditions caractérisées par une faible activité glycogènolytique (WILLIAMSON, 348 ; OPIE, 228 ; RANDLE, 270).

Il nous semble donc, que l'état métabolique de l'animal, ainsi que la concentration du substrat exogène dans le milieu de perfusion sont des facteurs non négligeables. Leur contrôle parfait est un élément nécessaire pour toute étude de la chaine respiratoire in situ, à l'aide des techniques fluorimétriques

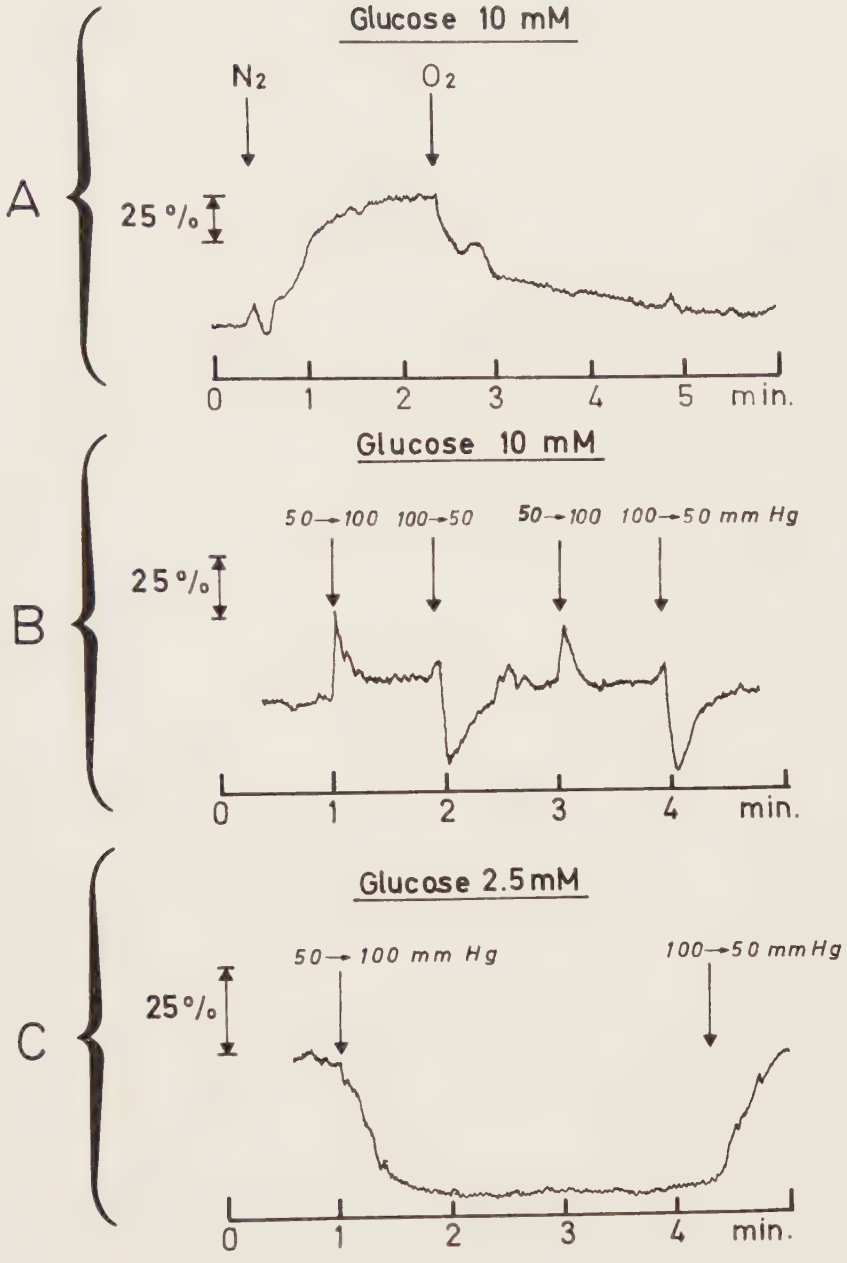


FIG. 20. EFFET D'UNE ANOXIE (A) ET D'UNE AUGMENTATION DE LA PRESSION DE PERFUSION (B,C) SUR L'EMISSION FLUORESCENTE DES PYRIDINE NUCLEOTIDES DU COEUR ISOLE. EFFET DE LA [c] DU SUBSTRAT EXOGENE.

Rat à jeun pendant 24 heures, glucose 2,5 et 10 mM, émission initiale - 100 %.

TABLEAU 9

EFFET DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR LE POTENTIEL REDOX DES PYRIDINE NUCLEOTIDES DU COEUR DE RAT PERFUSE AVEC DU GLUCOSE

Pression de perfusion	Glucose 2,5 mM			Glucose 10 mM		
	NADH	NAD^+	$\frac{NAD^+}{NADH}$	NADH	NAD^+	$\frac{NAD^+}{NADH}$
100 mm Hg	264 ± 14	4235 ± 105	$16,3 \pm 0,9$	257 ± 22	4185 ± 78	$17,3 \pm 1,5$
50 mm Hg	312 ± 18 *	4380 ± 95	$14,4 \pm 0,8$	221 ± 15	3915 ± 71 *	$18,5 \pm 1,4$

nmoles/gdw, $\bar{m} \pm$ SM, $n \leqslant 8$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

(CHANCE, 35, 36, 39 ; ERECINSKA, 44 ; JÖBSIS, 189 ; CHAPMAN, 48).

- Corrélation entre la vitesse de la respiration et le potentiel redox des pyridine nucléotides du coeur isolé.

Une modeste tentative d'exploiter les résultats fluorimétriques de façon semi-quantitative a été faite. La consommation d'oxygène du coeur isolé a été augmentée progressivement, en augmentant la pression de perfusion par paliers. Une corrélation négative, très significative, entre les performances mécaniques (donc de la MVO_2) et le degré de réduction du NADH est suggérée par la courbe obtenue (Fig. 21). Il nous semble, que sur un seul coeur, les fluctuations de la respiration pourraient être quantifiées par des mesures fluorimétriques du NADH tissulaire. C'est d'ailleurs ce que font actuellement JÖBSIS et collaborateurs (48, 123, 125). Selon ces auteurs, le $\Delta F1$ et surtout, la surface intégrée de signes fluorescents ($\int F1$) reflètent sensiblement le coût énergétique d'une série de contractions cardiaques (Fig. 10). Connaissant le travail fourni par le muscle, le rendement énergétique et ses fluctuations sont étudiés au cours de diverses conditions expérimentales (effort, épreuves pharmacodynamiques, etc.) (JÖBSIS, 189 ; CHAPMAN, 48).

2. Etude des transitions respiratoires du coeur isolé par enregistrement des spectres d'absorption des cytochromes.

- a) Données de base

Les difficultés d'interprétation des résultats fluorimétriques expliquent le développement des

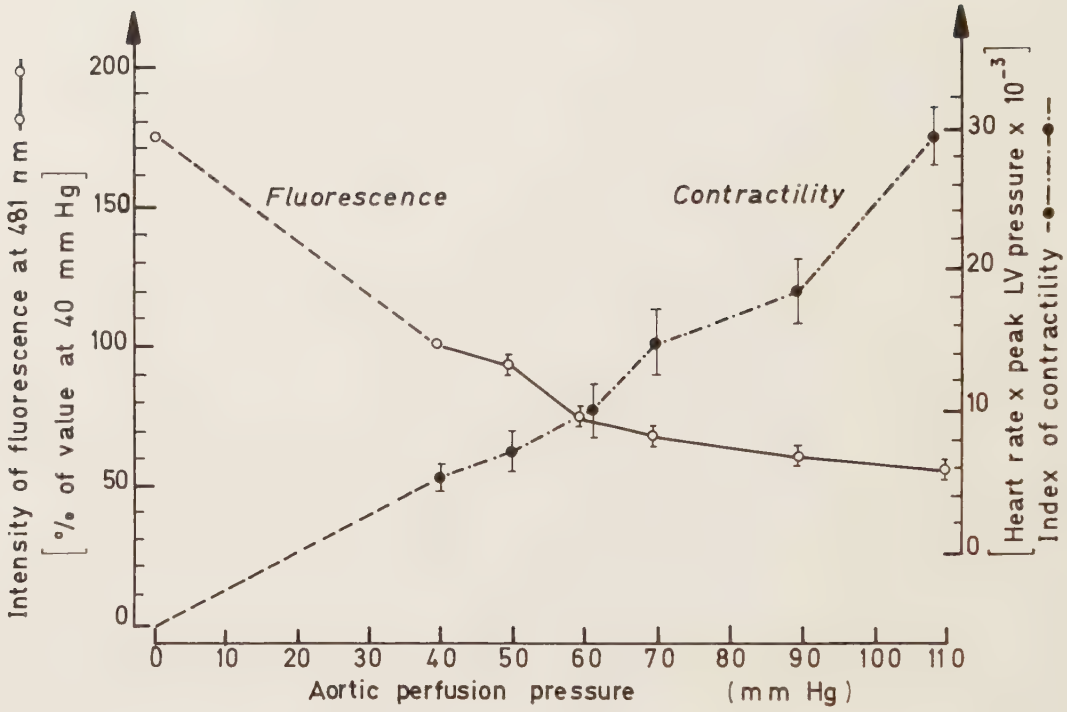


FIG. 21. EFFET DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR LES PERFORMANCES MECANIQUES DU COEUR PERFUSE DE RAT ET LE DEGRE DE REDUCTION DES PYRIDINES NUCLEOTIDES MESURE IN SITU (n = 9, m $\pm$ SE).

techniques spectrométriques, permettant d'étudier in situ le degré de réduction des cytochromes, essentiellement intramitochondriaux (CHANCE, 36, 43, 44 ; LÜBBERS, 73, 179).

La figure 22 montre le spectre différentiel d'une suspension mitochondriale exposée, après une période de normoxie (ligne de référence), aux effets de l'azote pur (CHANCE, 36). On peut remarquer l'existence de plusieurs pics appartenant aux formes réduites du pyridine dinucléotide (NADH) des flavoprotéines (FP) et des cytochromes b, c et a. Leurs maxima respectifs sont les suivants (LEHNINGER, 168) :

coenzyme	nm		
PdN	-	340	-
FP	-	470	-
b	564	532	429
c	550	521	415
a	600	-	439
a_3	606	-	443
cytochromes uniquement	α	β	γ

Les mêmes pics d'absorption peuvent être retrouvés sur les cellules intactes (CHANCE, 31, 37 ; LÜBBERS, 180). Cependant, on doit tenir compte de l'existence des autres polychromes absorbant dans le visible. Dans le cas du muscle cardiaque, il s'agit surtout de la myoglobine, dont la structure est très proche de celle des cytochromes, et dont le spectre d'absorption varie en fonction du degré d'oxygénation (Fig. 23). Il

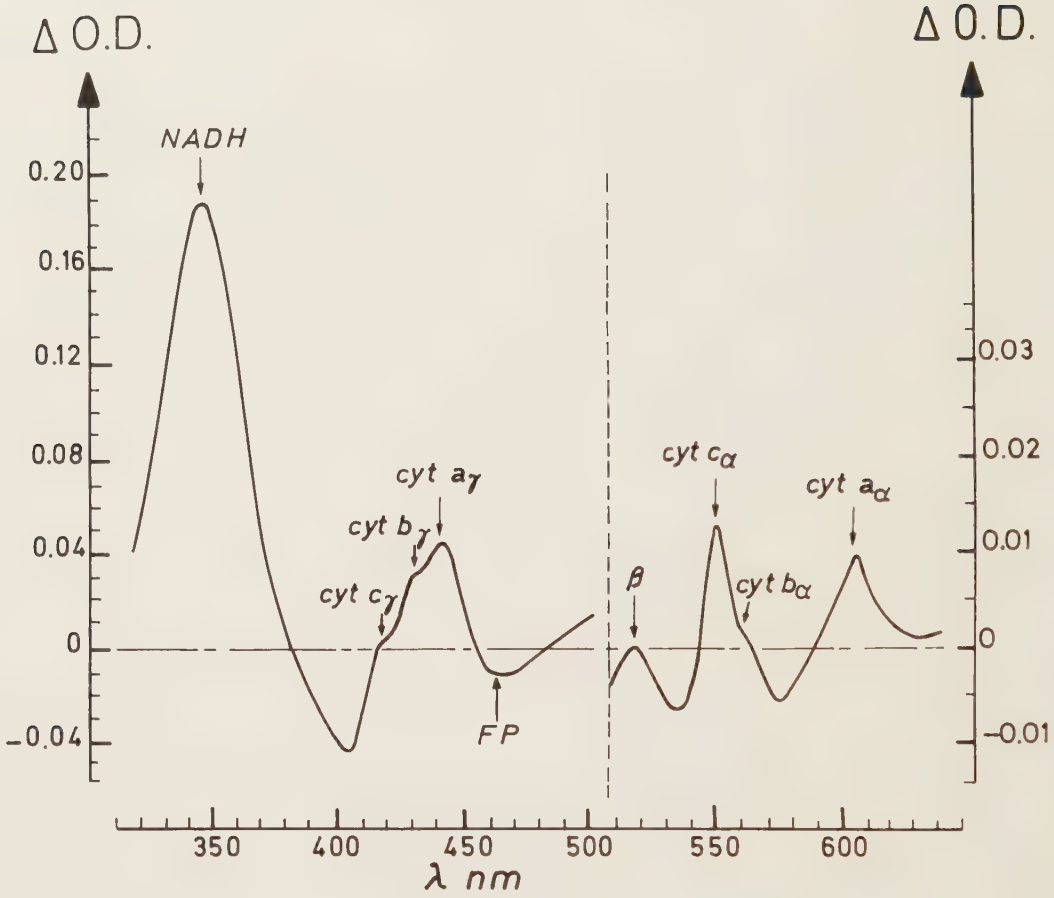


FIG. 22. SPECTRE DIFFERENTIEL DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES APRES LA TRANSITION DE L'ETAT 4 (NORMOXIQUE) A L'ETAT 5 (ANOXIQUE). Selon B. CHANCE.

A noter la localisation des pics d'absorption des cytochromes (pics α, β, γ), des flavoprotéines (FP) et du NADH.

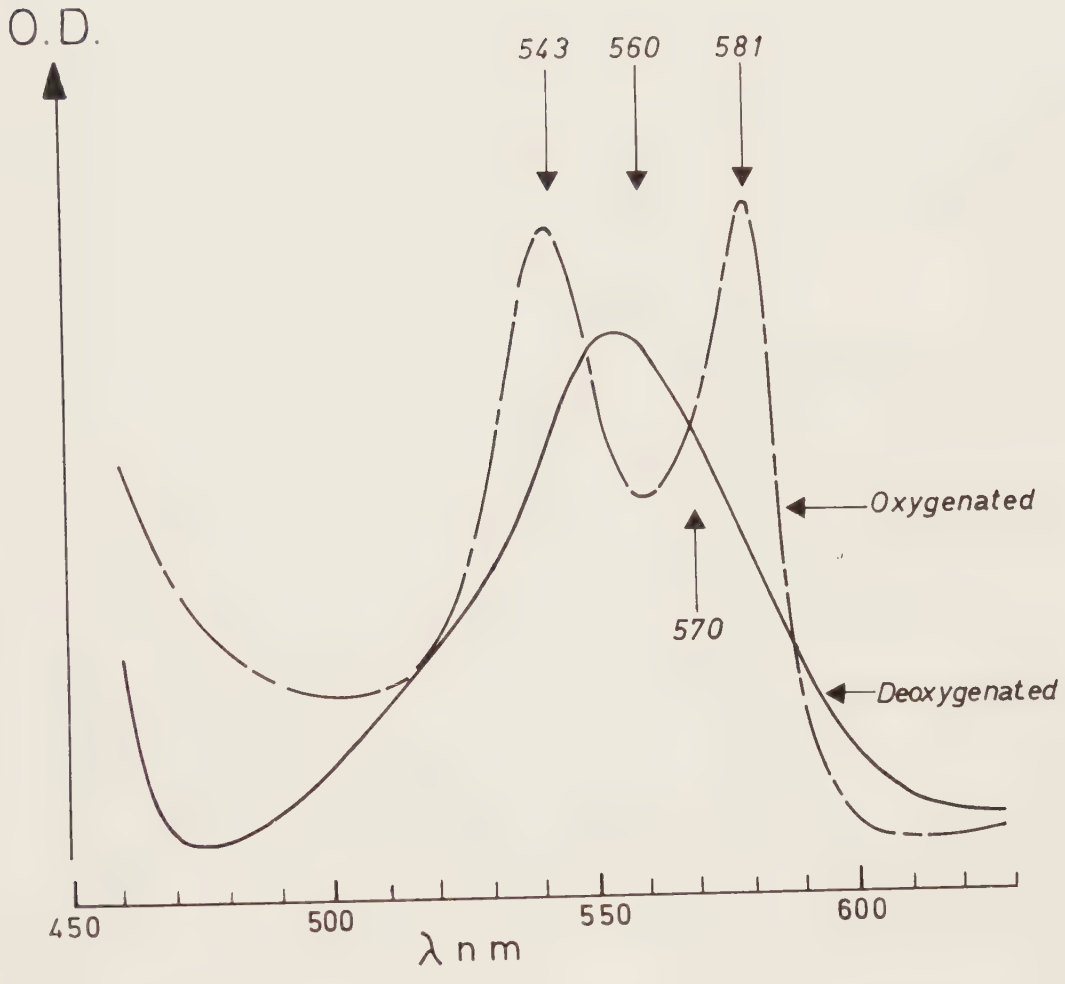


FIG. 23. SPECTRES D'ABSORPTION DE LA MYOGLOBINE ET DE L'OXYMYOGLOBINE BOVINES.

A noter les maxima d'absorption à 543, 560 et 581 nm, et les points isosbestiques à 515, 548, 570 nm (spectres enregistrés dans le laboratoire de Mme LEROUX, Hôpital Cochin).

y a un seul pic d'absorption a l'état oxygéné (560 nm) qui disparait au cours d'une désoxygénation, et en même temps il y a une augmentation de la densité optique à 540 et 580 nm. Le degré de saturation de la myoglobine peut être étudié in vitro par une mesure différentielle de l'absorption à 580 et 570 nm (LÜBBERS,181) ou à 580 et 620 nm (CHANCE, cf. 181).

Il faut remarquer que le maximum de la myoglobine désoxygénée se trouve exactement entre les pics β du cytochrome b et c (respectivement 564 et 550 nm). Pour étudier la cinétique de la chaine respiratoire du muscle cardiaque, il conviendrait alors de supprimer toute modification de la saturation de la myoglobine. Ceci est faisable soit chimiquement (CHANCE, 45) par sa peroxydation, soit par le maintien de la pO_2 intracellulaire aux valeurs supranormales. L'emploi du KREBS-HENSELEIT, équilibré avec 95 % d'O_2 et 5 % de CO_2, devrait aider à réaliser cette deuxième possibilité (LÜBBERS, 170), car dans ces conditions la pO_2 intracellulaire est rarement au dessous de 200 torr. Nous avons choisi cette deuxième possibilité.

- b) Spectres d'absorption du coeur arrêté

Dans le premier temps, nous avons enregistré les spectres d'absorption normoxique et anoxique sur un coeur arrêté par perfusion d'une solution contenant 16 mmoles/l de KCl. Plusieurs points isosbestiques peuvent être remarqués sur les enregistrements superposés des deux spectres : 412, 438, 456, 508, 531, 548, 572, 594, 630 nm (Fig. 24). On les retrouvent également sur le spectre différentiel (Fig. 25) enregistré dans les mêmes conditions. Les pics d'absorption du spectre diffé-

FIG. 24. SPECTRES D'ABSORPTION D'UN COEUR ISOLE ARRETE, SUCCESSIVEMENT NORMOXIQUE (— — — —) ET ANOXIQUE (————).

A noter la localisation des différents pics d'absorption et l'existence de nombreux points isosbestiques. Enregistrement réalisé avec le Rapid Scanning Spectroscope T 13/3 du Max Planck Institut.

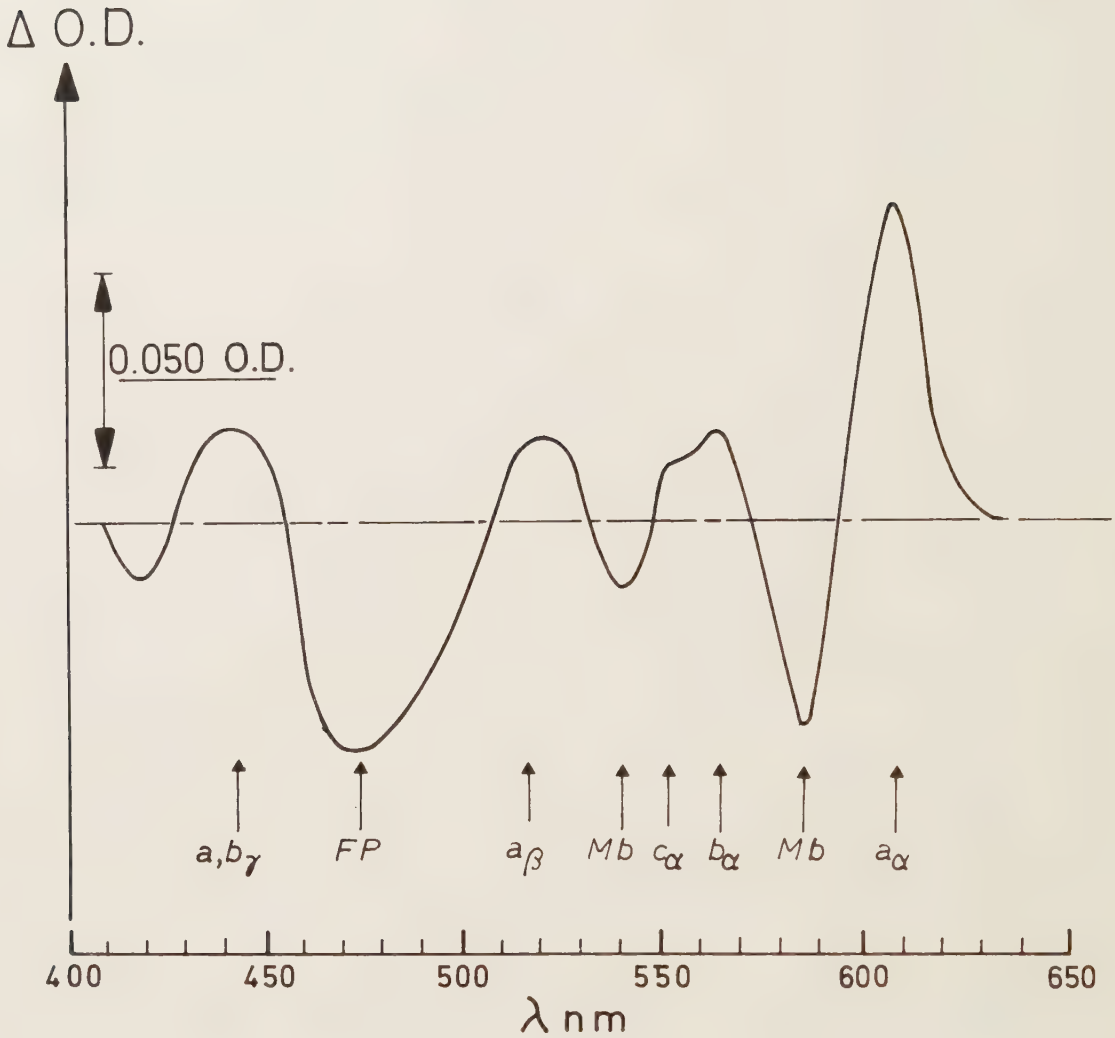


FIG. 25. SPECTRE DIFFERENTIEL D'UN CORPS ISOLE ARRETE, SUCCESSIVEMENT NORMOXIQUE (— - — - —) ET ANOXIQUE (————).

A noter que certains pics observés correspondent assez bien aux maxima d'absorption des coenzymes respiratoires et ceux de la myoglobine : FP (470 nm) cyt a (606,-,443nm), cyt b (564, 532, 429 nm), cyt c (550, 521, 415 nm) myoglobine (581, 560, 543 nm).

rentiel (442, 474, 516, 540, 552, 564, 584, 606 nm) correspondent relativement bien à ceux déterminés par CHANCE sur une suspension mitochondriale (Fig. 22 ; tableau p92). Nous retrouvons pratiquement tous les coenzymes respiratoires absorbant dans la région spectrale examinée : les cytochromes a, b, et c, les flavoprotéines et la myoglobine. Nos spectres ressemblent également à ceux précédemment enregistrés sur les coeurs isolés de la tortue (LUBBERS, 181) et du rat (CHANCE,45).

- c) Spectres d'absorption du coeur battant

En utilisant le "double-wave lenght spectroscope" du Professeur B. CHANCE (43), nous avons ensuite étudié les spectres d'absorption des cytochromes sur le coeur battant. Après la lecture du spectre de référence, l'état respiratoire de la préparation a été modifié par une anoxie ou par l'augmentation de la pression de perfusion. Le deuxième spectre a été lu au cours du nouvel état stationnaire et le spectre différentiel respectif fut enregistré. Pour protéger la préparation, la durée de la période anoxique ne dépassait jamais 2 min.

L'effet d'une anoxie sur le potentiel redox des cytochromes est illustré sur la première courbe de la Fig. 26. La localisation et l'amplitude des pics sont comparables avec celles décrites sur le coeur arrêté par l'excès du potassium (Fig. 25).

L'accélération de la chaine respiratoire, secondaire à une augmentation de la pression de perfusion de 50 à 100 mmHg entraine une image en miroir de la cour- anoxique. Cette oxydation des cytochromes cardiaques est

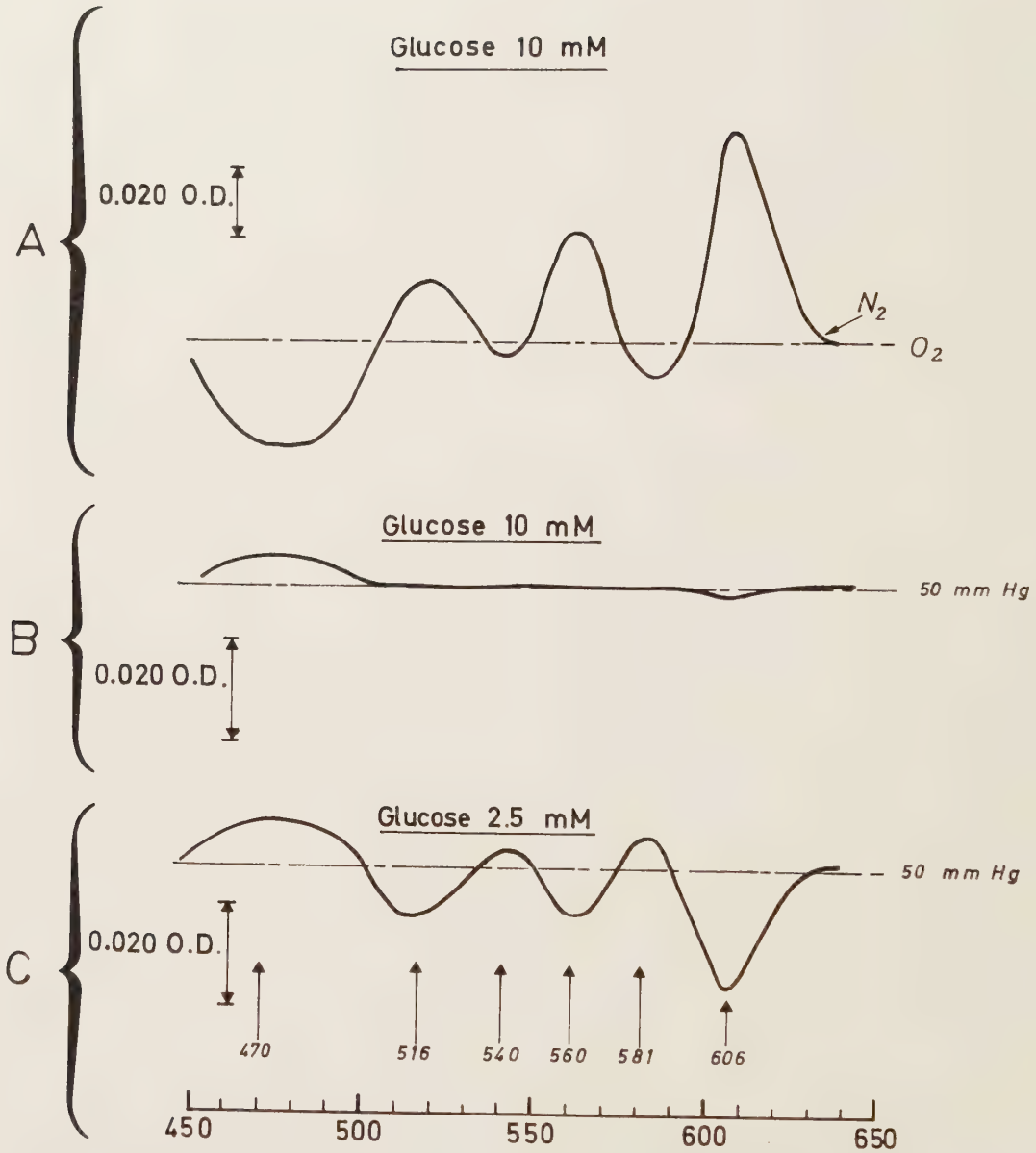


FIG. 26. EFFET D'UNE ANOXIE (A) ET D'UNE AUGMENTATION DE LA PRESSION DE PERFUSION DE 50 A 100 mmHg (B, C) SUR L'ABSORPTION DES CYTOCHROMES DU COEUR ISOLE. EFFET DE LA [c] DU SUBSTRAT EXOGENE - SPECTRES DIFFERENTIELS.

Rats à jeun pendant 24 heures, glucose 2,5 ou 10 mM.

cependant observée uniquement en présence de faibles concentrations du substrat (glucose 2,5 mM dans ce cas précis). Elle est absente quand on perfuse avec un excès de substrat exogène (Fig. 26 B et 26 C).

Le choix du substrat semble avoir un rôle mineur, car les résultats comparables ont été obtenus au cours des perfusions avec le glucose et les corps cétoniques (Fig. 27). Chaque groupe expérimental, caractérisé par des conditions métaboliques données, comprend au moins cinq coeurs. L'enregistrement dé différents spectres sur un seul coeur perfusé successivement avec des milieux à faibles et fortes concentrations de substrat rend le résultat encore plus significatif. Une augmentation progressive de la pression de perfusion s'accompagne d'une oxydation de plus en plus grande de la chaine respiratoire, compatible avec les modifications de la MVO_2 déjà discutées (Fig. 28).

Le résultat le plus significatif est cependant l'absence complète de modifications redox des cytochromes cardiaques, observée dans des conditions caractérisées par une accélération significative de la respiration (Tableau 4). Il complète nos résultats fluorimétriques et souligne encore plus l'importance d'un contrôle strict de l'état métabolique de la préparation, dont la respiration sera étudiée par les méthodes optiques (cf. CHAPMAN, 48).

Les conditions métaboliques particulières du coeur isolé ne nous permettent pas une extrapolation aisée de nos résultats aux autres modèles expérimentaux (muscle papillaire, coeur poumon, coeur in situ). Les discordances concernant, par exemple, des répercussions

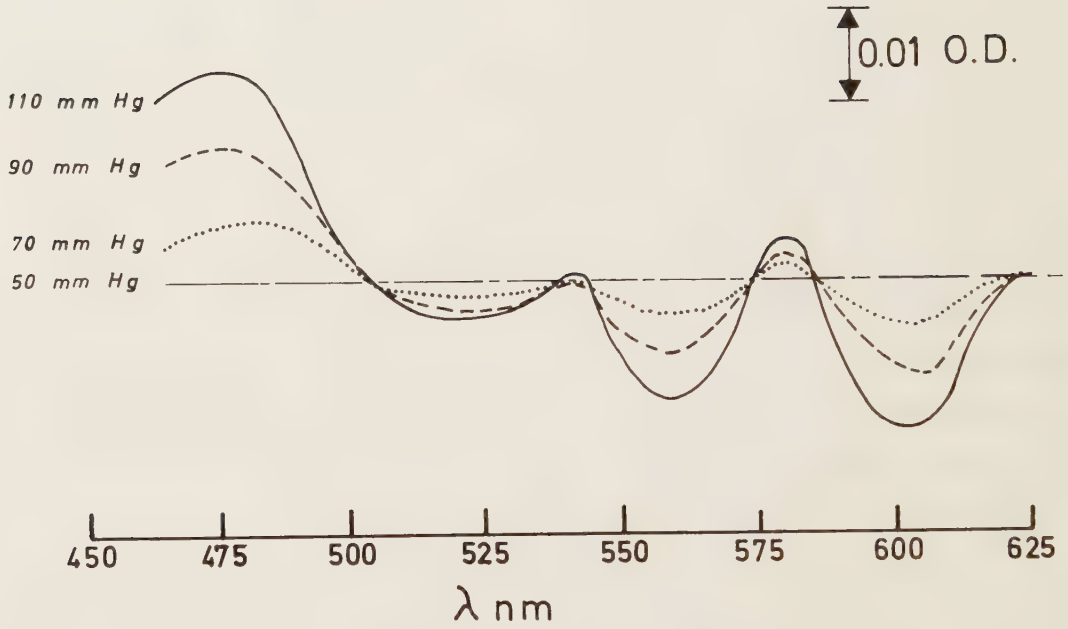


FIG. 27. EFFET D'UNE AUGMENTATION PROGRESSIVE DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR L'ABSORPTION DES CYTOCHROMES CARDIAQUES - SPECTRES DIFFERENTIELS.

Rat à jeun pendant 24 heures, d-β-OH-butyrate 2,5 mM.

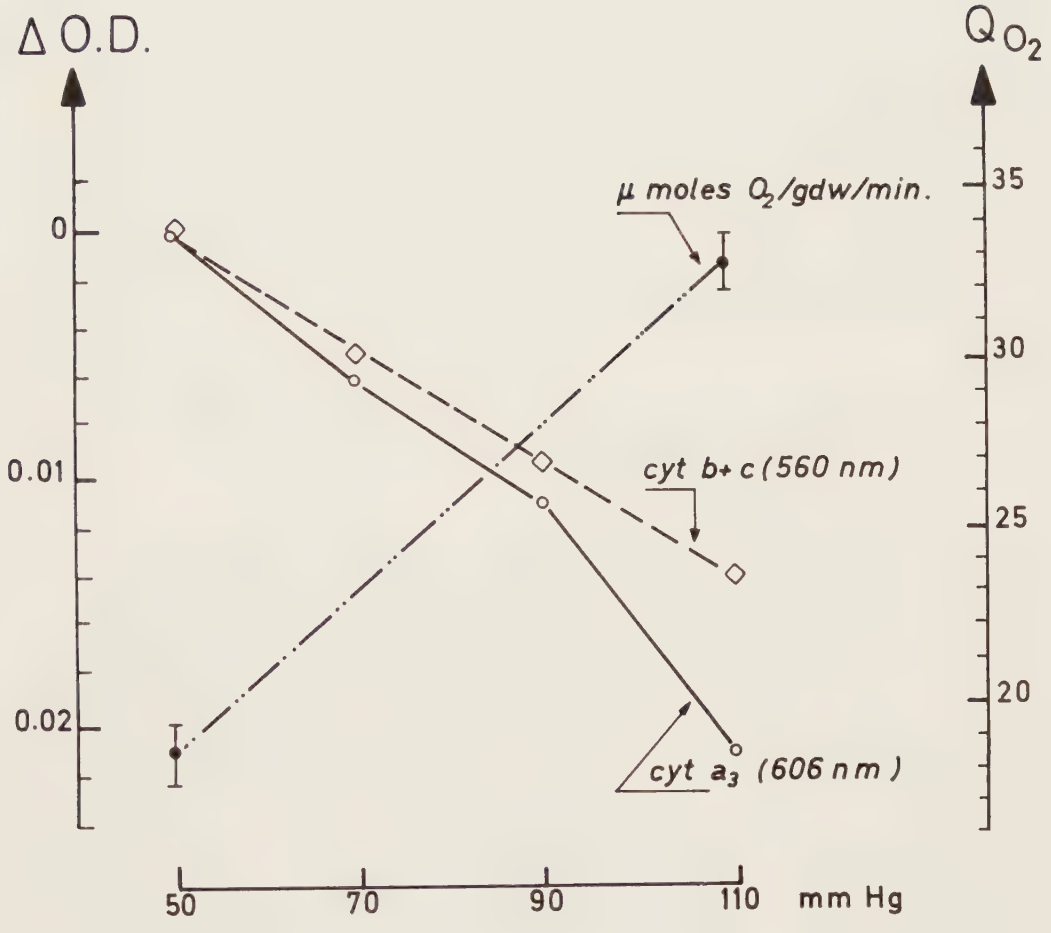


FIG. 28. EFFET DE LA PRESSION DE PERFUSION SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DU COEUR PERFUSE DE RAT ET LE DEGRE DE REDUCTION DES CYTOCHROMES CARDIAQUES MESURE IN SITU (QO_2, n = 10, analyse spectroscopique, n = 5).

métaboliques d'une seule contraction cardiaque (LÜBBERS,73; CHANCE, 45 ; CHAPMAN, 48) pourraient être interprétées à la lumière de nos résultats. Il nous semble qu'en présence d'un pool important d'hydrogène (substrat 10 mM) le potentiel redox de la chaine respiratoire pourrait être maintenu en dépit des fluctuation significatives de la vitesse de la respiration. Une relation entre le degré de réduction de la chaine respiratoire et la concentration du substrat exogène a d'ailleurs été suggéré par CHANCE et WILLIAMS (36, Fig. 9).

3. Etude de l'activité du cycle de KREBS du coeur intact

Une corrélation étroite devrait en principe exister entre la vitesse du transport des électrons et l'activité métabolique du cycle de KREBS (KREBS, 152 ; La NOUE, 159, 355 ; NEELY, 219). Le lien entre ces deux voies métaboliques devrait être principalement assuré, selon certains auteurs, par le rapport NAD/NADH intramitochondrial (La NOUE, 160). L'absence des changements redox des pyridine nucléotides mitochondriaux, qui selon nos résultats peut accompagner les transitions respiratoires du coeur isolé, suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans le contrôle de l'activité du cycle de KREBS : les altérations de l'adénylate charge (ATP/ADP + Pi (SHEPHERD, 300 ; RANDLE, 271) et les effets feed-back (La NOUE, 159 ; SMITH, 308 ; WILLIAMSON, 355) ont été proposés. Il serait intéressant de définir le mécanisme exact qui l'emporte dans nos conditions expérimentales (coeur isolé travaillant perfusé en présence du glucose ou du d-β-OH-butyrate 2,5 et 10 mM).

Un contrôle biochimique des résultats fluorimétriques et spectroscopiques est d'ailleurs indispensable, car il s'agit de techniques assez aveugles, soumises à de nombreux artéfacts (présence de polychromes liés au cytosol et le réticulum sarcoplasmique, fluctuations de la diffraction du faisceau au cours de la contraction cardiaque (CHANCE, 45 ; JÖBSIS, 189). C'est pourquoi nous avons essayé d'introduire dans notre laboratoire les techniques biochimiques permettant de contrôler l'activité métabolique du cycle de KREBS, notamment de certains de ses enzymes clefs.

- a) Etude de l'activité de la citrate synthase du coeur travaillant

Les coeurs isolés de rat ont été perfusés selon NEELY (216) par l'oreillette gauche avec un KREBS-HENSELEIT, contenant du glucose 5 mM et de l'acétate 5 mM. Ce dernier a été employé pour rendre plus facile le dosage de l'acétyl-CoA (RANDLE, 271). Pendant 15 min la pression de remplissage était de 10 mmHg, la résistance à l'éjection systolique de 60 mmHg (coeurs de contrôle). La consommation d'oxygène a été ensuite doublée par une perfusion de 5 min contre une résistance accrue à l'éjection systolique (surcharge aiguë) : 43,30 $\pm$ 10,21 et 75,00 $\pm$ 12,60 umoles O_2/gdw/min respectivement. Les coeurs ont été alors congelés et traités pour l'analyse biochimique des intermédiaires du cycle de KREBS (WILLIAMSON, 345).

Dans une autre expérience, l'activité du cycle de KREBS a été diminuée par une perfusion de 5 min de KREBS-HENSELEIT équilibré avec un mélange gazeux contenant 60 % d'O_2 et 40 % de CO_2. Le pH final était de 6,6, suf-

fisant pour inhiber partiellement le citrate synthase (SCHAFFER, 290). La consommation d'oxygène n'a pas été calculée dans cette série d'expériences, car les valeurs du débit coronaire étaient trop faible (1-2 ml/min) pour être mesurées avec précision.

La Fig. 29 montre les effets de la surcharge mécanique et de l'inhibition du cycle de KREBS sur les taux des composés riches en énergie. Les résultats sont assez comparables avec les données récentes de la littérature (NEELY, 219 ; SCHAFFER, 290). La créatine phosphate baisse dans les deux conditions, le taux d'ATP est beaucoup plus touché au cours d'une acidose qu'à l'effort aigu. Le rapport ATP/ADP décroit dans les deux cas, les taux d'ADP et celui d'AMP augmentent uniquement au cours de l'acidose sévère (SAFER, 287).

Une accumulation du lactate et une augmentation du rapport lactate/pyruvate (Fig. 30) reflètent vraisemblablement une réduction cytosolique secondaire à l'inhibition du malate/aspartate shuttle (pH 6,6) (SCHAFFER, 290 ; SAFER, 287), soit une accélération de la glycolyse (effort) (OPIE, 232 ; NEELY, 216) liée au turnover élevé des adénine nucléotides.

Quant aux métabolites de la citrate synthase (Fig. 31), nous voyons au cours de l'effort une diminution du malate et de l'acétyl-Co A, caractéristique d'une activation de la citrate synthase (NEELY, 219 ; SMITH, 308). Les taux d'oxaloacétate étaient trop faibles, pour que nous puissions les mesurer avec précision. Une diminution non significative du taux de citrate reflète vraisemblablement une activation des autres enzymes clefs du cycle

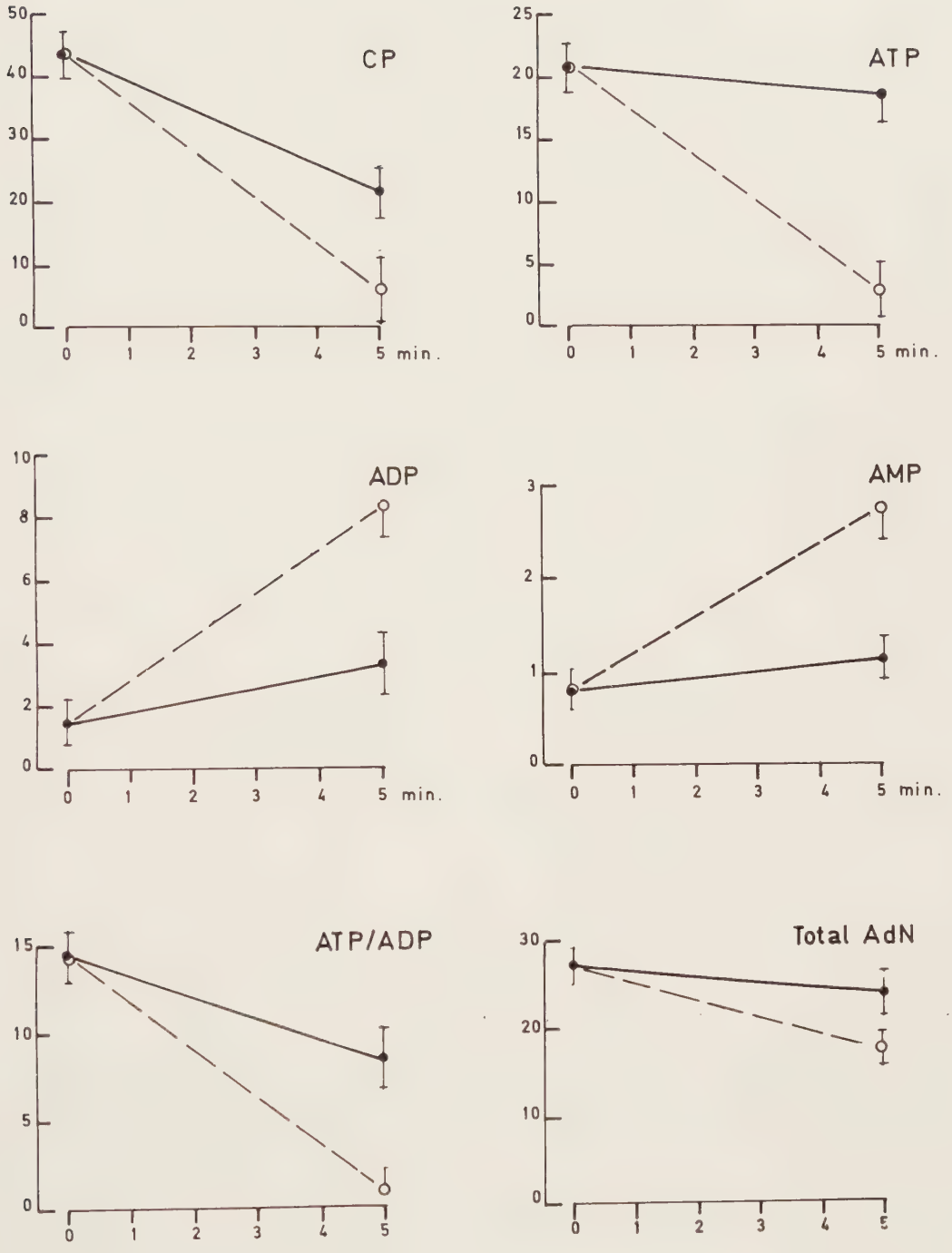


FIG. 29. EFFETS D'UNE SURCHARGE AIGUE (————) ET D'UNE ACIDOSE (— — — —) SUR L'ADENYLATE CHARGE DU COEUR ISOLE TRAVAILLANT.

/umoles/dgw n = 6, m $\pm$ SE.

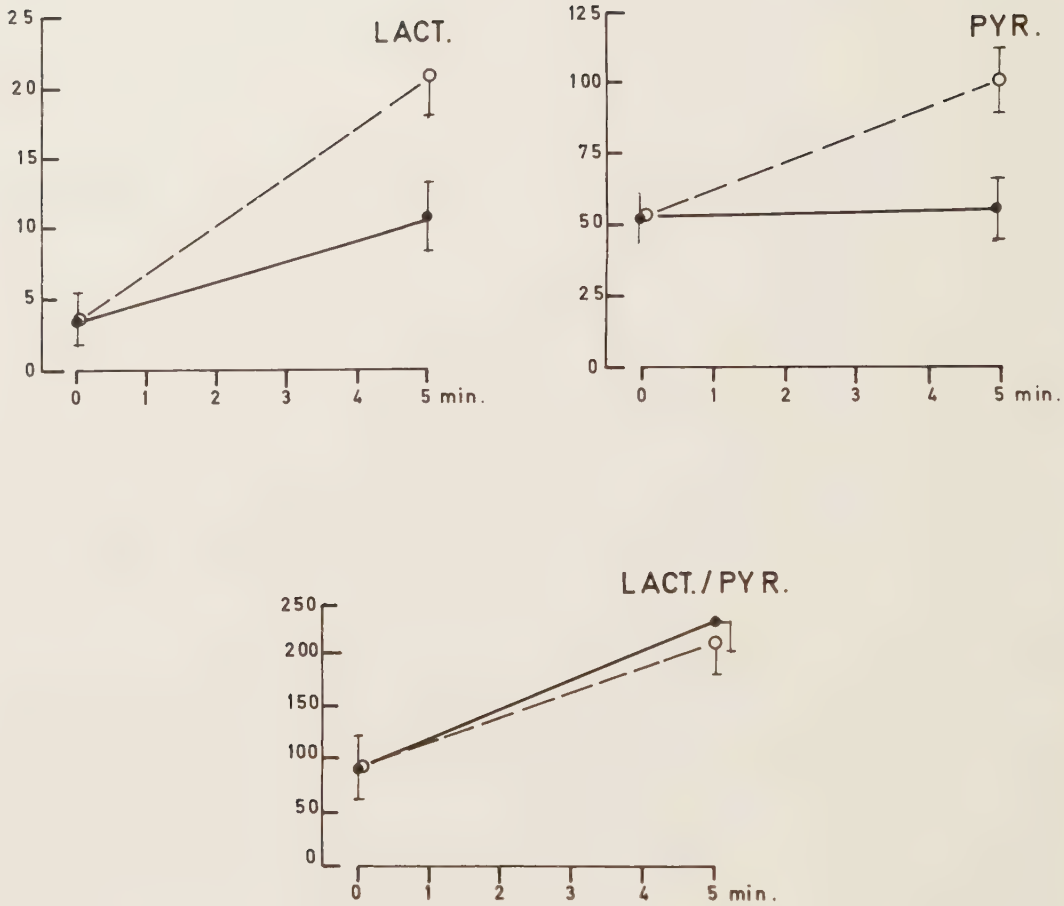


FIG. 30. EFFETS D'UNE SURCHARGE AIGUE (———) ET D'UNE ACIDOSE (– – – –) SUR LE POTENTIEL REDOX DU CYTOSOL DU COEUR ISOLE TRAVAILLANT.

/umoles (lactate) et nmoles (pyruvate)/gdw, n = 6, m $\pm$ SE.

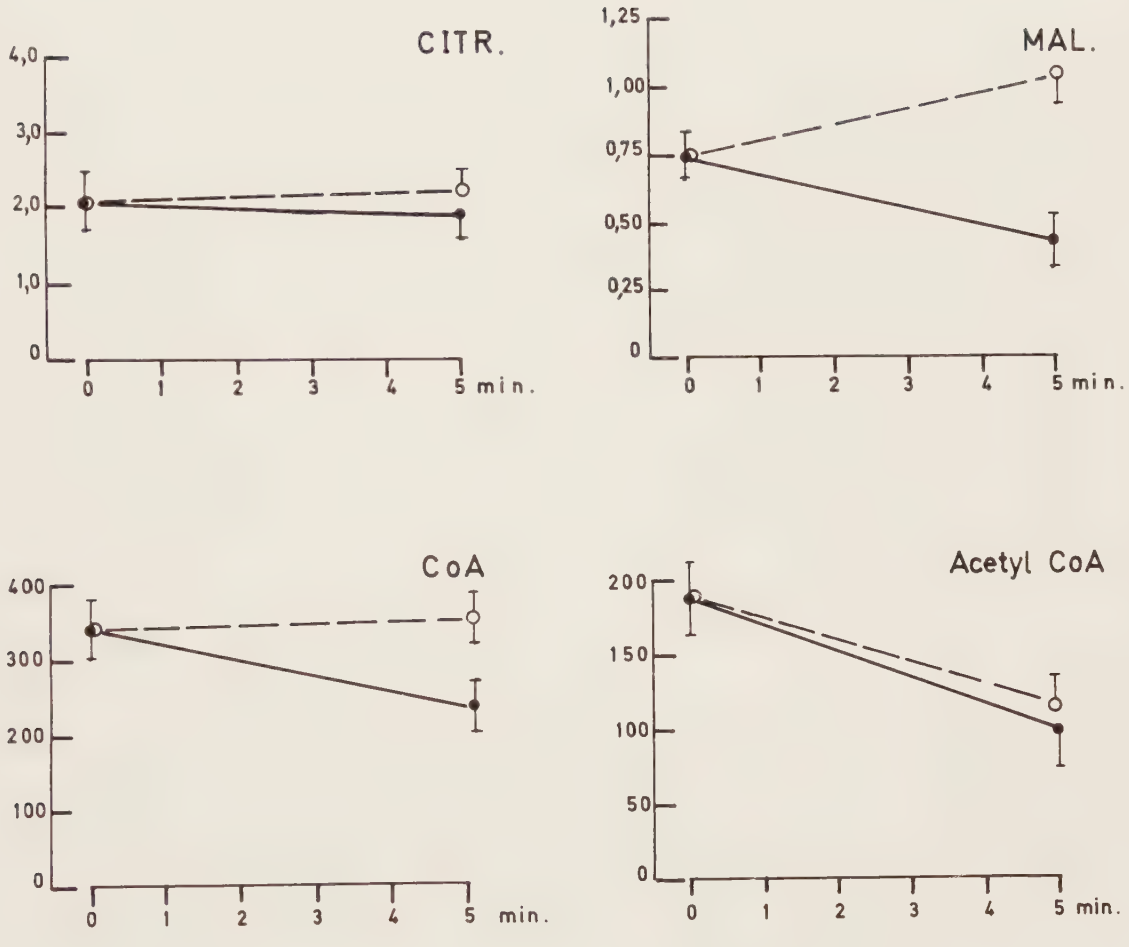


FIG. 31. EFFETS D'UNE SURCHARGE AIGUE (———), ET D'UNE ACIDOSE (— — —) SUR L'ACTIVITE DE LA CITRATE SYNTHASE DU COEUR ISOLE TRAVAILLANT.

µmoles (citrate, malate), ou nmoles (CoA, acetyl-CoA)/gdw, n = 6, m ± SE.

de KREBS, notamment de l'isocitrate deshydrogénase et de l'α cétoglutarate deshydrogénase (WILLIAMSON, 355).

Au cours de l'acidose, nous voyons en gros une image en miroir du tableau précédent : accumulation du malate et légère augmentation du citrate. La première modification, ainsi qu'une baisse de l'acétyl-Co A peuvent être interprétées comme conséquences d'une réduction des pyridine nucléotides du cytosol (SAFER, 287), secondaire à l'inhibition du malate/aspartate shuttle (SCHAFFER, 290) et favorisent la synthèse des acides gras à longues chaines. L'accumulation du pyruvate peut également être interprétée comme secondaire au bloc du transport des hydrogènes du cytosol à l'intérieur des mitochondries (SAFER, 287).

Les résultats que nous venons de décrire ne sont que le début d'un travail plus systématique. Le nombre d'expériences fait jusqu'ici est trop faible pour pouvoir en tirer des conclusions importantes. Néanmoins, la ressemblance de nos résultats à ceux de NEELY et DENTON (219) , SCHAFFER (290) et WILLIAMSON (287) est certaine. Il nous semble prouver, au cours d'un effort du coeur isolé perfusé, une activation cu cycle de KREBS. Par contre, une inhibition de la citrate synthase est présente au cours d'une acidose combinée à une hypoxie.

Une étude simultanée biochimique et biophysique de l'activité métabolique mitochondriale des coeurs isolés soumis à un effort aigu, est actuellement en cours.

III. CONCLUSION

La mise au point de nouvelles techniques permettant d'étudier l'activité fonctionnelle des mitochondries cardiaques au cours de diverses conditions pathologiques (hypertrophie ventriculaire, insuffisance cardiaque, par exemple) est justifiée par de nombreuses raisons.

Tout d'abord, la notion selon laquelle l'insuffisance cardiaque et en particulier celle qui succède à une surcharge mécanique ne s'accompagne pas d'un trouble de la production d'énergie est à la fois ancienne (BING, OLSON, cf. 230) et non totalement prouvée (COOPER, 56 ; GUNNING, 94).

Si, dans un certain nombre de cas d'insuffisances cardiaques chroniques, il parait bien ne pas exister de troubles grossiers du métabolisme énergétique (COOPER, 55 ; OLSON, cf. 230), dans d'autres (surcharge mécanique importante, insuffisance cardiaque aiguë, COOPER, 56 ; COLEMAN, 57) la présence d'un tel trouble est indiscutable. Le caractère de la surcharge parait très important, car la production mitochondriale d'énergie est surtout altérée au cours d'une surcharge de pression. Une surcharge de débit (LEVINE, 171 ; MORET, 212) peut être beaucoup mieux tolérée (COOPER, 55), parfois elle est suivie d'une amélioration du rendement énergétique (cf. HATT, 102). Il nous a paru dans ces conditions utile d'aborder un des chainons clés du métabolisme énergétique, c'est à dire, la production d'énergie par les mitochondries.

Le sujet est également intéressant du point de vue fondamental. Les techniques couramment utilisées pour l'étude des fonctions mitochondriales (mitochondries isolées notamment) ne peuvent pas répondre à toutes les questions que pose la pathologie expérimentale, dont la préoccupation principale est l'état fonctionnel des organes intacts.

Nous avons essayé d'aborder le problème de trois manières différentes : (1) par l'étude de l'ultrastructure mitochondriale après une fixation standardisée (cf. FORSSMANN, 79 ; HATT, 107) ; (2) par l'étude in vivo de la respiration en mesurant optiquement le potentiel redox de la chaine respiratoire (CHANCE, 43 ; JÖBSIS, 124 ; LÜBBERS, 179) ; et (3) par les dosages biochimiques des substrats de la citrate synthase - enzyme clé du cycle de KREBS - (SCHAFFER, 290 ; SMITH, 308 ; NEELY, 219).

Les résultats de ces expériences font apparaitre les faits suivants :

1. <u>Microscopie électronique : corrélation entre l'ultrastructure et l'état fonctionnel des mitochondries cardiaques</u> :

- Les lésions cardiaques provoquées par l'isoprotérénol sont en général paucicellulaires. Elles sont caractérisées par des altérations précoces des myofibrilles, localisées surtout au niveau des bandes I et des lignes Z. Une myolyse diffuse peut parfois apparaître. La structure des mitochondries est souvent bien conservée en dépit de modifications fonctionnelles importantes (accélération de la chaine respiratoire et/ou découplage). Ce n'est que dans les cellules très endommagées

(nécrose cellulaire) que nous avons rencontré des mitochondries anormales, siège d'une séquestration de sels calciques (BLOOM, 13 ;PEACHEY, 247). Il nous est difficile d'attribuer une signification précise à ces images, car les dépôts calciques ont été fréquemment signalés dans des conditions au cours desquelles l'activité respiratoire des mitochondries ne semble pas être touchée (MAURAT, 125 ; HEGGTVEIT, 110 ; D'AGOSTINO, 62).

- Une hypoxie respiratoire aiguë (2 heures à 6 % O_2), ainsi qu'une hypoxie respiratoire chronique (10-30 jours à 9 % O_2) ne sont pas accompagnées par un gonflement des mitochondries, bien que cette constatation soit largement répandue dans la littérature (BÜCHNER, 21 ; ONISHI, 227 ; SULKIN, 321), si les précautions nécessaires pour assurer une fixation rapide sont prises.

Une analyse morphométrique révèle cependant, une augmentation de la densité des capillaires dans le myocarde hypoxique. Il y a également une diminution de la taille moyenne des mitochondries reflétant, peut-être, un phénomène d'adaptation (VALDIVIA, 323 ; WACHTLOVA, 334).

- Sur les coeurs isolés perfusés, il n'y a pas après fixation in situ, la moindre corrélation entre l'ultrastructure et la fonction des mitochondries cardiaques. En dépit de modifications significatives de la consommation d'oxygène (découplage, inhibition de l'oxydation phosphorylante, state 4 - to - 3 transition, inhibition du transport des électrons), l'aspect tout à fait identique des mitochondries (aspect "orthodoxe") est régulièrement présent quelles que soient les conditions métaboliques réalisées.

La microscopie électronique ne peut donc pas être considérée comme une technique suffisamment sensible pour étudier l'activité fonctionnelle des mitochondries in situ.

2. Etude de l'activité respiratoire du coeur isolé de rat par les techniques optiques

- Les fluctuations du potentiel redox des pyridines nucléotides (PdN) et celui des cytochromes ont été mesurés sur coeur perfusé afin d'étudier sa respiration. Le degré de réduction des PdN a été déterminé soit chimiquement (WILLIAMSON, 345) soit par les mesures in vivo de l'émission fluorescente du NADH (CHANCE, 31 ; JÖBSIS,36). Sur la même préparation, le degré de réduction des cytochromes (a_3, b, c) était étudié par les mesures d'absorption en visible. (CHANCE, 43 ; LÜBBERS, 179).

- Dans les conditions métaboliques particulières, caractérisées par une activité moindre de la glycolyse (animaux à jeun, d-β-OH-butyrate 2,5 mM), une relation étroite entre le taux intracellulaire des formes réduites des coenzymes respiratoires et la vitesse du transport des électrons a été retrouvée en accord avec les travaux d'autres auteurs. Le degré de réduction est d'autant plus grand que la respiration est ralentie. La réduction est complète au cours d'une perfusion anoxique. Au cours d'une surcharge mécanique, quand la consommation d'oxygène (MVO_2) augmente (application des drogues inotropes positives, augmentation de pression de perfusion), une oxydation des PdN est régulièrement présente. L'absence de toute modification du rapport lactate/pyruvate (tissulaire et celui du liquide de perfusion) suggère que le lieu des fluctuations redox des PdN se situe essentiellement à l'intérieur des mitochondries.

- Les résultats spectroscopiques semblent confirmer cette possibilité, car dans les conditions métaboliques identiques, l'augmentation du travail cardiaque entraine régulièrement une oxydation des cytochromes c (550 nm), b (564 nm) et a_3 (606 nm). La consommation d'oxygène augmente en même temps du simple au double. Une perfusion anoxique entraine régulièrement la réduction des cytochromes étudiés, caractérisée par l'augmentation de l'absorption.

- Cependant, la relation entre la MVO_2 et le potentiel redox de la chaine respiratoire peut être sensiblement atténuée, ou même disparaitre complètement, quand le glucose 10 mM et les animaux nourris ad libitum sont employés. Dans ces conditions, une accélération de la chaine respiratoire de même ordre que dans le cas précédent ne s'accompagne plus de la moindre modification du potentiel redox des PdN ni de celui des cytochromes.

- Ces résultats suggèrent qu'une modification du potentiel redox intramitochondrial n'est pas la condition sine que non d'une accélération du turnover métabolique. Quand le pool intracellulaire des hydrogènes disponibles est suffisamment élevé (glucose 10 mM) le "débit" accru des électrons le long de la chaine respiratoire semble être compensé par l'augmentation du flux des équivalents réductifs au travers de la membrane mitochondriale. De ce fait, un état redox stationnaire peut être maintenu malgré les fluctuations significatives de la respiration.

Les résultats suggèrent également que le potentiel redox intramitochondrial, notamment celui du couple NADH/NAD, n'est pas le seul facteur impliqué dans le contrôle du cycle de Krebs. D'autres facteurs, tels que les fluctuations de l'adénylate charge (ATP/ADT + Pi) et les mécanismes feedback doivent être envisagés.

Enfin, l'importance d'un contrôle vigoureux des conditions métaboliques de la préparation nous paraît indispensable, surtout si nous voulons quantifier la réponse métabolique à l'aide des techniques optiques.

- Les dosages biochimiques des différents métabolites tels que les adénine nucléotides, pyridine nucléotides, métabolites du cycle de Krebs, ont également été faits dans l'espoir de mieux comprendre les mécanismes du contrôle des voies métaboliques mitochondriales. Il s'agit, pour le moment, de résultats tout à fait fragmentaires. Néanmoins, une activation de la citrate synthase au cours d'une surcharge aiguë du coeur isolé, ainsi que son inhibition au cours d'une perfusion à pH bas ont pu être démontrées.

- L'emploi simultané des techniques biochimiques et des méthodes optiques à l'étude des métabolismes énergétiques nous paraît offrir un meilleur contrôle de la cinétique des différentes voies métaboliques. Il est notamment utile à la compréhension des interactions mitochondrio-cytosoliques, telles qu'elles existent in vivo.

IV. - SUMMARY

The research into new techniques for the study of mitochondrial function of heart muscle under normal and pathological conditions is of use for the following reasons.

Firstly, the classical notion there is no disturbance in energy production in the failing heart is now not generally accepted (COOPER, 56 ; GUNNING, 94). Many conflicting results concerning this problem have appeared recently.

No gross modification in energy production was found in volume overloaded heart (COOPER, 55 ; OLSON cf.230). However, after aortic constriction, especially during the initial period of the resulting pressure overload, mitochondrial damage has been demonstrated (COOPER, 56 ; COLEMAN, 57). After removal of the stenosis the initial conditions of energy production appear to be reestablished. In addition, LEVINE (171) and MORET (212) found an improvement in oxygen utilization after a long-lasting volume overload. These conflicting results, together with the well-known difficulty of precise evaluation of "internal work" (BRITMAN, 20) suggests that the further search for a better understanding of myocardial energetics is useful.

Most of the above results concern experiments in which oxygen consumption values were used as an index of mitochondrial activity. More direct information concerning the in vivo state of mitochondrial energy production under the above experimental conditions in scarce. The development of new research techniques for an application to this question is thus justified.

Such work is also of fundamental interest : the techniques usually employed to test mitochondrial function (i.e. isolated mitochondria) have provide little information for the experimental pathologist, since the interactions between mitochondria and the cytosol are not respected in vitro. These interactions are intricately involved in the control of mitochondrial energy production in vivo. It appears therefore that the best way to study mitochondrial function is to maintain mitochondria in situ (MEIJER, 188). Simultaneous recording of the rate of energy production and expenditure would thus allow determination of the efficiences of energy transformations in intact muscle.

In this study, we have tested three metodological approaches to the investigation of mitochondrial respiratory activity : (1) electron microscopic analysis of mitochondrial structure was performed after fixation in vivo, (2) fluctuations of the redox conditions of the respiratory chain have been recorded optically (CHANCE, 43 ; JÖBSIS, 124 ; LÜBBERS, 179) and (3) the turnover of the citric acid cycle has been evaluated biochemically (SMITH et WILLIAMSON, 308 ; NEELY, 219). The correlations between respiratory rate and the observed phenomena have been examined.

The principal results are the following :

1) Electron microscopy : the absence of a relationship between ultrastructure and respiratory state of heart mitochondria.

a) Large doses of a β-agonist, isoproterenol, have been found to induce myocardial damage in rats (RONA, 279). The "oxygen wasting" effect, leading to an overloading of the respiratory chain, or the presence of tissue hypoxia have been suggested to explain these lesions.

In our experiments on rats and on perfused rabbit hearts fixed by an intracoronary perfusion of the fixative we have confirmed the focal distribution fo isoproterenol-induced lesions. Myofibrillar alterations appeared very early on. They consisted of stretched Z-lines and alterations of I-bands. In some cells diffuse myolysis appeared. The structure of the mitochondria appeared, however, quasi-normal, despite the significant acceleration of the respiratory chain.

In necrotic cells, the sequestration of electron-dense material, presumably calcium soaps (BLOOM, 13 ; De LEIRIS, 65) has been found 3 hours after the administration of the drug. Similar mitochondrial alterations have been described in a number of experimental cardiac necroses (MAURAT, 125 ; HEGGTVEIT, 110 ; D'AGOSTINO,62). This renders difficult any functional interpretation of these lesions.

b) The exposure of rats to acute severe hypoxia (2 hours at 6 % O_2) or chronic moderate hypoxia (10-30 days at 9 % o_2) did not significantly change myocardial ultrastructure. After a fixation of the heart in situ we have never encountered the "hypoxic-like" swelling (JENNINGS, 121), which is generally considered as the sign of decreased respiratory rate and low intracellular pO_2 (SULKIN, 321 ; ONISHI, 227 ; BÜCHNER, 21). The ultrastructure of hypoxia mitochondria was very similar to that of control hearts fixed by the same technique.

The results of a morphometric study, however, showed the following differences in the ultrastructure of control and hypoxic myocardia : increased capillary density and smaller mitochondria were found in hypoxic

hearts. According to VALDIVIA (323), WACHTLOVA (334) and OU (234), these changes might reflect an adaptive mechanism compensating for the decreased oxygen supply to the heart.

c) The respiratory activity of the perfused rabbit heart was modified by low pO_2 and a number of inhibitors acting on the respiratory chain and oxydative phosphorylation (antimycin A, catecholamines, dinitrophenol, oligomycin). The possibility of a correlation between mitochondrial function and ultrastructure (GREEN, 89 ; HACKENBROCK, 95) has been tested. Our results suggest that despite significant modifications in respiratory rate there are no ultrastructural differences between mitochondria fixed in situ in different functional states (state 3, state 4, state 5, uncoupling, inhibition of oxydative phosphorylation). On the other hand, mitochondrial structure proved to be extremely sensitive to fixation artifacts : a very short delay between the end of blood perfusion and beginning of the fixation can induce the "hypoxic-like" mitochondrial swelling.

The above results seem to reject the possibility of a respiration related "mechanochemical activity" of the mitochondria in situ (HACKENBROCK, 97) and suggest that electron microscopy is not an adequate technique for the study of mitochondrial metabolic state of intact myocardium. Osmotic and electrolytic disturbancies are certainly more important for the control of mitochondrial volume and E.M. appearance.

2) Study of the respiratory activity of isolated rat heart by means of optical techniques

- Fluctuations in the redox state of pyridine nucleotides (PdN) and other respiratory coenzymes of

isolated rat heart were monitored and compared with values of oxygen consumption (MVO_2). The degree of the reduction of PdN was determined fluorimetrically (CHANCE, 37 ; JÖBSIS, 122) and biochemically (WILLIAMSON, 345). That of flavoproteines and cytochromes (a_3, b, c) was determined from absorption changes detected by a reflection spectroscope (CHANCE,143; LÜBBERS, 181).

- In the particular metabolic conditions characterized by a low glycogenolytic activity (fasting animals, d-β-OH-butyrate 2.5 mM) we found the relationship between respiratory rate and the redox state of pyridine nucleotides to be as described by other workers : when respiration is accelerated, increased perfusion pressure, catecholamine administration, the total PdN is shifted to an oxidized state (state 4 to state 3 transition). During an anoxic perfusion, when the respiratory rate is zero, the PdN becomes 100 % reduced (state 5).

The absence of any significant modifications in the redox state of the cytosol (no change of lactate/pyruvate ratio) suggests that the redox changes observed, when the left ventricular mechanical activity is increasing, take place essencially in the mitochondria. This possibility is further supported by the results of spectroscopic analysis which under similar conditions shows an oxydation of mitochondrial cytochromes and flavoproteins.

However, the relationship between MVO_2 and the redox state of the respiratory chain was absent, when glucose 10 mM and fed animals were used. Under these

conditions an increase in the mechanical performance of the left ventricle was not accompanied by an oxidation of respiratory carriers, despite the significant increase in oxygen consumption.

These results suggest that the modifications in the redox state of PdN and that of the cytochromes are not an obligatory consequence of increased metabolic turnover. If the intracellular pool of available hydrogen is high enough (10 mM glucose), steady redox conditions of the respiratory chain appear to be maintained possibly by enhanced transmembrane fluxes of reducing equivalents.

Our results also suggest that the intramitochondrial redox state of pyridine nucleotides is not the only factor involved in the controls of the citric acid cycle. In low substrate perfused hearts a dissociation between its turnover and the NAD/NADH ratio is regularly present. In this case, other control mechanisms such as modifications in adenylate charge (ATP/ADP + Pi) and feed back mechanisms must come into play.

Another point which we would like to emphasize is the necessity of strict control of metabolic conditions of the preparation whose respiratory activity is to be studied by means of optical techniques. This point has been neglegted in the past.

Preliminary results concerning modifications of the activity of citrate synthetase during low pH perfusion and secondary to increased mechanical load to the perfused rat heart are also given. Biochemical studies, performed simulteneously with optical recor-

ding of respiratory activity, appears to be a useful tool when applied to the study of metabolic control in situ. Better understanding of mitochondrio-cytosolic interactions in normal myocardium as well as their modifications under experimental conditions should thus be obtained by using these techniques.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à la compétence de nombreux collaborateurs. Je tiens à remercier ici Mr. A. CORSIN, Mme F. CHATEAU, Mme M.T. DRONNE, Melle H. GUILLEMOT, Mr. ELKHALSI, Mme. F. MAROTTE, et M. F. SERRELL.

Je remercie également les docteurs S. HARRISON, K. GIBSON, P. JOUANNOT, Susan Van NOORDEN, K. OHKAWA et J. SENNESH pour leur soutien et leurs remarques critiques.

Les bourses des organismes suivants m'ont permis de mener à bien ce travail :

- Československá Akademie Věd
- Ministère Français des Affaires Etrangères
- Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique
- British Medical Research Council
- National Institute of Health
- Fondation Française pour la Recherche Médicale
- Medical Department of ICI-Pharmaceuticals
- CIBA France

BIBLIOGRAPHIE

1. ABBOTT, B. : Energetics and the heat of shortening. In : Factors influencing myocardial contractility, p. 387. Tanz, R. D., Kavaler, R., Roberts, J. (Eds), Academic Press, London, 1967.

2. ADDANKI, S., CAHILL, F. D., SOTOS, J. F. : Intramitochondrial pH and intra-extramitochondrial gradient of beef heart mitochondria in various functional states. Nature, 214 : 400, 1967.

3. ADDANKI, S., CAHILL, F. D., SOTOS, J. F. : Determination of intramitochondrial and extramitochondrial pH gradient of isolated heart mitochondria by use of 5.5 Dimethyl-2-4 oxazolidiendione. J. Biol. Chem., 243 : 2337, 1968.

4. ASAI, J., BLONDIN, G. A., VAIL, W. J., GREEN, D. E. : The mechanism of mitochondrial swelling. IV. Configurational changes during swelling of beef heart mitochondria. Arch. Bioch. Biophys., 132 : 524, 1969.

5. ATKINSON, D. E. : Adenine nucleotides as stoichiometric coupling agent in metabolism and as regulatory modifiers : the adenylate charge. In : Metabolic Pathways, vol. V, 3rd ed., p. 1, Vogel, H. J. (Ed), Academic Press, London, 1971.

6. BAJUSZ, E. : Electrolytes and Cardiovascular Disease. S. Karger, Basel, 1965.

7. BARANY, M., TUCCI, A. F., CONOVER, T. E. : Comparative studies of rabbit cardiac and skeletal myosins'. Arch. Bioch. Biophys., 106 : 280, 1963.

8. BECKER, E. L. : Myocardium in puppies born at a simulated altitude of 20,000 feet. Amer. J. Physiol., 183 : 203, 1955.

9. BISCHOFF, M. B., DEAN, W. D., BUCCI, J. J., FRIES, L. A. : Ultrastructural changes in the myocardium of animals after five months residence at 14,110 feet. Feder. Proc., 28 : 1268, 1969.

10. BISHOP, S. P., COLE, C. R. : Ultrastructural changes in the canine myocardium with right ventricular hypertrophy and congestive failure. Labor. Invest., 20 : 219, 1969.

11. BLAIR, P. V., ODA, T., GREEN, D. E., FERNÁNDEZ-MORÁN, H. : Studies on the electron transfer system. LIV. Isolation of the unit of electron transfer. Biochemistry, 2 : 756, 1963.

12. BLAIR, P. V., MUNN, E. A. : Regulation of mitochondrial oxidations by induction of morphological changes. I. Dinitrophenol initiated concomitant transitions in inner membrane-matrix structure and succinate oxidation. Bioch. Biophys. Res. Communications, 43 : 727, 1972.

13. BLOOM, S., CANCILLA, P. A. : Myocytolysis and mitochondrial calcification in rat myocardium after lower doses of isoproterenol. Amer. J. Pathol., 54 : 373, 1969.

14. BOYER, P. C. : Role of conformational changes in energy transduction. In : Oxidases and related redox systems, vol. 2, p. 994, King, T. E., Mason, H. S., Morrison, M. (Eds), John Wiley and Sons, N. Y., 1964.

15. BOZNER, A., KNIERIEM, H. J., MEESEN, H., REINAUER, H. : Die ultrastruktur und Biochemie des Herzmuskels der Ratte im Thiamin mangel und nach einer Gabe von Thiamin. Virchows Arch. B. Zell Pathol., 2 : 125, 1969.

16. BRACHFELD, N., APSTEIN, C. S. : The influence of available substrate on contraction of the hypoxic myocardium. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 423, Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

17. BRANDOLIN, G., MEYER, C., DEFAYE, G., VIGNAIS, P. M., VIGNAIS, P. V. : Partial purification of an atractyloside-binding protein from mitochondria. FEBS Letters, 46 : 149, 1974.

18. BREMER, J. : Carnitine in intermediary metabolism. The metabolism of fatty acid esters of carnitine by mitochondria. J. Biol. Chem., 237 : 3628, 1963.

19. BREMER, J., NORUM, K. R., FARSTAD, M. : Intracellular distribution of some enzymes involved in the metabolism of fatty acids. In : Mitochondrial Structure and Compartimentation, p. 380, Quagliariello, E., Papa, S., Slater, E. C., Tager, J. M. (Eds), Adriatic Ed., Bari, 1967.

20. BRITMAN, N. A., LEVINE, H. J. : Contractile element work : a major determinant of myocardial O_2 consumption. J. Clin. Invest., 43 : 1397, 1964.

21. BÜCHNER, F., ONISHI, S. : Der Herzmuskel bei akuter Koronarinsuffizienz im elektronenmikroskopischen Bild. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, 1968.

22. BURGOS, M. H. : Mitochondrial damage in the heart under normal and experimental conditions. 6^{th} international Congress for Electron Microscopy, Kyoto, 1966.

23. BURTON, A. C. : Physiology and biophysics of the circulation. Year Book medical Publishers Inc., Chicago, 1965.

24. BUSCH, W. A., STROMER, M. H., GOLL, D. E., SUZUKI, A. : Calcium activated specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. J. Cell Biol., 52 : 367, 1972.

25. BUTLER, W. H., JUDAH, J. D. : Preparation of isolated rat liver mitochondria for electron microscopy. J. Cell Biol., 44 : 278, 1970.

26. CALLAS, G., HAYES, J. R. : Alterations in the fine structure of cardiac muscle mitochondria induced by hyperthyroidism. Anat. Rec., 178 : 539, 1974.

27. CARAFOLI, E. : Role of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the calcium shifts in the cardiac cell. In : Les surcharges cardiaques, p. 193, Hatt, P. Y. (Ed), INSERM, Paris, 1972.

28. CARAFOLI, E. : Mitochondria, Ca^{++} transport and the regulation of heart contraction and metabolism. J. Mol. Cell. Cardiol., 7 : 85, 1975.

29. CHALLONER, D. R., STEINBERG, D. : Oxidative metabolism of myocardium influenced by fatty acids and epinephrine. Amer. J. Physiol., 211 : 897, 1966.

30. CHALLONER, D. R. : Mechanism of oxygen utilisation as related to work function in isolated perfused rat heart. J. Lab. Clin. Med., 70 : 995, 1967.

31. CHANCE, B. : Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells. Nature, 169 : 215, 1952.

32. CHANCE, B. : The response of mitochondria to muscular contraction. Ann. N. Y. Acad. Sci., 81 : 477, 1959.

33. CHANCE, B. : The respiratory chain as a model for metabolic control in multi-enzyme systems. Control of Energy Metabolism, p. 9, Academic Press London, 1965.

34. CHANCE, B. : The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J. Biol. Chem., 240 : 2729, 1965.

35. CHANCE, B. : The kinetics of flavoprotein and pyridine nucleotide oxidation in cardiac mitochondria in the presence of calcium. FEBS Letters, 26 : 315, 1972.

36. CHANCE, B., WILLIAMS, G. R. : Respiratory chain and oxidative phosphorylation. Advan. Enzymol., 17 : 65, 1956.

37. CHANCE, B., THORELL, B. : Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry. J. Biol. Chem., 234 : 3044, 1959.

38. CHANCE, B., HAGIHARA, B. : Initiation of succinate oxidation in aged pigeon mitochondria. Bioch. Biophys. Res. Comm., 3 : 1, 1960.

39. CHANCE, B., HOLLUNGER, J. : The interaction of energy and electron transfer systems in mitochondria. III. Substrate requirements for pyridine nucleotides reduction by mitochondria. J. Biol. Chem., 236 : 1555, 1961.

40. CHANCE, B., PARSON, D. F. : Negative staining of "oxysomes" in ascaris mitochondria. Science, 142 : 1176, 1963.

41. CHANCE, B., MELA, L. : Intramitochondrial pH changes in cation accumulation. Biochemistry, 55 : 1243, 1966.

42. CHANCE, B., AZZI, A., LEE, I. Y., LEE, C. P., MELA, L. : The nature of the respiratory chain, location of energy conservation sites, the high energy stores, electron-transfer-linked conformational changes and the "closedness" of submitochondrial vesicles. FEBS Symposium Mitochondria, Structure and Function, vol. 17, p. 233. Ernster, L., Drahota, Z. (Eds), Academic Press London, 1969.

43. CHANCE, B., GRAHAM, N. : A rapid scanning dual wavelenght spectrophotometer. Rev. Sci. Instrum., 42 : 941, 1971.

44. CHANCE, B., ERECINSKA, M. : Flow flash kinetics of the cytochrome a_3-oxygen reaction in coupled and uncoupled mitochondria. Arch. Bioch. Biophys., 143 : 675, 1971.

45. CHANCE, B., TAMURA, M., OSHINO, N., SALKOWITZ, I. : Criteria of cardiac anoxia and bioenergetic activity. Feder. Proc., 33 : 425, 1974.

46. CHANCE, B., WILSON, P. L., DUTTON, P. F., ERECINSKA, M. : Energy-coupling mechanism in mitochondria : kinetic spectroscopic and thermodynamic properties of an energy-transducing form of cytochrome b. Proc. Natl. Acad. Sci., 66 : 1175, 1970.

47. CHAPMAN, J. B., GIBBS, C. L., GIBSON, W. R. : Effects of calcium and sodium on cardiac contractility and heat production. Circul. Res., 27 : 601, 1970.

48. CHAPMAN, J. B. : Fluorimetric studies of oxidative metabolism in isolated papillary muscle of the rabbit. J. Gen. Physiol., 59 : 135, 1972.

49. CHAPPELL, J. B., GREVILLE, G. D. : The influence of the suspending medium on the properties of mitochondria. Bioch. Soc. Symp., n° 23 : 39, 1963.

50. CHAPPELL, J. B. : Systems for the transport of substrates into mitochondria. British Med. Bull., 24 : 150, 1968.

51. CHAPPELL, J. B., ROBINSON, B. H. : Penetration of the mitochondrial membrane by tricarboxylic acid anions. Bioch. Soc. Symp., n° 27 : 123, 1968.

52. CLANCY, R. L., GRAHAM, T. P., ROSS, J., SONNENBLICK, E. H., BRAUNWALD, E. : Influence of aortic pressure-induced homeometric autoregulation on myocardial performance. Amer. J. Physiol., 214 : 1186, 1968.

53. COBURN, R. F., PLOEGMAKERS, F., GONDRIE, P., ABBOUD, R. : Myocardial myoglobin oxygen tension. Amer. J. Physiol., 224 : 870, 1973.

54. COCKRELL, R. S., HARRIS, E. J., PRESSMAN, B. C. : Synthesis of ATP driven by a potassium gradient in mitochondria. Nature, 215 : 1487, 1967.

55. COOPER, G., PUCA, F. J., ZUJKO, K. J., HARRISON, C. E., COLEMAN, H. N. : Normal myocardial function and energetics in volume overload hypertrophy in the cat. Circul. Res., 32 : 140, 1973.

56. COOPER, G., SATAVA, R. M., HARRISON, C. E., COLEMAN, H. N. : Mechanism of the abnormal energetics of pressure-induced hypertrophy of cat myocardium. Circul. Res., 33 : 213, 1973.

57. COOPER, G., SATAVA, R. M., HARRISON, C. E., COLEMAN, H. N. : Normal myocardial function and energetic after reversing pressure overloaded hypertrophy. Amer. J. Physiol., 226 : 1158, 1974.

58. CORABOEUF, E., VASSORT, G. : Effects of some inhibitors of ionic permeabilities on ventricular action potential and contraction of rat and guinea-pig hearts. J. Electrocardiology, 1 : 19, 1968.

59. CORABOEUF, E. : Membrane electrical activity and double component contraction in cardiac tissue. J. Mol. Cell. Cardiology, 6 : 215, 1974.

60. CRASS, M. F., Mc CASKILL, E. S., SHIPP, J. C., MURTHY, V. K. : Metabolism of endougenous lipids in cardiac muscle : effect of pressure development. Amer. J. Physiol., 220 : 428, 1971.

61. CRONIN, R. F. P. : Effect of isoproterenol and norepinephrine on myocardial function in experimental cardiogenic shock. Amer. Heart J., 74 : 387, 1967.

62. D'AGOSTINO, A. N. : An electron microscopic study of skeletal and cardiac muscle of the rat poisoned by plasmocid. Labor. Invest., 12 : 1060, 1963.

63. D'AGOSTINO, A. N. : An electron microscopic study of cardiac necrosis produced by 9-α-fluorocortisol and sodium phosphate. Amer. J. Pathol., 45 : 633, 1964.

64. D'AGOSTINO, A. N. : An electron microscopic study of cardiac necrosis produced by 9-α-fluorocortisol and Na Phosphate. Amer. J. Pathol., 45 : 633, 1964.

65. De LEIRIS, J., FEUVRAY, D. : Alterations ultrastructurales du myocarde ventriculaire après ligature d'une artère coronaire du coeur isolé perfusé en présence de différents substrats. 2ème Colloque annuel de la D.G.R.S.T. sur la Biologie et la fonction du myocarde, Paris, 13-14 Mars 1975.

66. DRAHOTA, Z., CARAFOLI, E., ROSSI, C. S., GAMBLE, R., LEHNINGER, A. L. : The steady state maintenance of accumulated Ca^{++} in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 240 : 2712, 1965.

67. De DUVE, C., WATTIAUX, R., BAUDHUIN, P. : Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. Advan. Enzymol., 24 : 291, 1962.

68. Du PRAW, E. J. : Cell and Molecular Biology. Academic Press, London, 1968.

69. EBASHI, S., EBASHI, F., KODAMA, A. : Troponin as the Ca-receptive protein in contractile system. Bioch. Biophys. Res. Comm., 31 : 647, 1967.

70. ERECINSKA, M., WILSON, D. F., DUTTON, P. L., CHANCE, B. : Kinetic interactions at site II during energy coupling reactions. Fed. Proc., 32 : 1981, 1973.

71. ERNSTER, L., LINDBERG, O. : Animal mitochondria. Ann. Rev. Physiol., 20 : 13, 1958.

72. EVANS, J. R., OPIE, L. H., SHIPP, J. C. : Metabolism of palmitic acid in perfused rat heart. Amer. J. Physiol., 205 : 766, 1963.

73. FABEL, H., LÜBBERS, D. W. : Measurement of reflection spectra of the beating heart in situ. Biochem. Zeitschrift, 341 : 351, 1965.

74. FABEL, H. : Normal and critical O_2-supply of the heart. In : Oxygen Transport in Blood and Tissue, p. Lübbers, E. W. (Ed), G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1968.

75. FERNÁNDEZ-MORÁN, H. : Cell-membrane ultrastructure. Circulation, 26 : 1039, 1962.

76. FLECKENSTEIN, A., JANKE, J., DOERING, H. J., LEDER, O. : The key-role of Ca in the production of non-coronarogenic myocardial necroses. In : Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, Vol. 6, p. 21-30, Fleckenstein, A., Rona (Eds), University Park Press, Baltimore, 1975.

77. FERRANS, V. J., HIBBS, R. G., WEILY, H. S., WEILBACHER, D. G., WALSH, D. G., BURCH, G. B. : Histochemical and Electron Microscopic study of epinephrine-induced myocardial necrosis. J. Mol. Cell. Cardiology, 1 : 11, 1970.

78. FOLLERT, E. K. : Significance of diffusion loss of oxygen in determining respiration of isolated, perfused organs. Pflüg. Arch., 323 : 80, 1971.

79. FORSSMANN, W. G., SIEGRIST, G., ORCI, L., GIRARDIER, L., PICTET, R., ROUILLER, C. : Fixation par perfusion pour la microscopie électronique. Essai de généralisation. J. Microscopie, 6 : 279, 1967.

80. FRIEDMAN, I., MORAVEC, J., REICHART, E., HATT, P. Y. : Electron microscopic study of the myocardium in lightly hypoxic rats. J. Mol. Cell. Cardiology, 5 : 125, 1973.

81. GARLAND, P. B., SHEPHERD, D., NICHOLLS, D. G., ONTKO, J. : Energy-dependent control of the tricarboxylic cycle by fatty acid oxidation in rat liver mitochondria. Advan. Eur. Regul., 6 : 3, 1968.

82. GARNIER, D., ROUGIER, O., GARGOUÏL, Y. M., CORABOEUF, E. : Analyse électrophysiologique du plateau des réponses myocardiques, mise en évidence d'un courant lent entrant en absence d'ions bivalents. Pflüg. Arch., 313 : 321, 1969.

83. GIBBS, C. L. : Role of catecholamines in heat production in the myocardium. Circul. Res., 20 and 21 : suppl. III : 223, 1967.

84. GOLDSTEIN, M. A., SORDAHL, L. A., SCHWARTZ, A. : Ultrastructural analysis of left ventricular hypertrophy in rabbits. J. Mol. Cell. Cardiology, 6 : 265, 1974.

85. GRAHAM, J. M., WALLACH, D. F. H. : Energy dependent conformational transition in mitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta, 193 : 225, 1969.

86. GREGG, D. E. : Relationship between coronary flow and metabolic changes. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 291. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

87. GREEN, D. E. : Studies in organized enzyme systems. Harvey Lectures, Ser. 52 : 177, 1958.

88. GREEN, D. E., ALLMANN, D. W., HARRIS, R. A., TAN, W. C. : Enzyme localization in the inner and outer membranes. Bioch. Biophys. Res. Comm., 31 : 368, 1968.

89. GREEN, D. E., BAUM, H. : Energy and the mitochondria. Academic Press, London, 1970.

90. GREENAWALT, J. W., ROSSI, C. S., LEHNINGER, A. L. : Effect of active transport of Ca^{++} and Phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria. J. Cell Biol., 23 : 21, 1964.

91. GRÜNWALD, W. : Theoretical analysis of the oxygen supply in tissue. In : Oxygen Transport in Blood and Tissue, p. 100. Lübbers, D. W., Luft, U. C., Thews, C., Witrleb, E. (Eds), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968.

92. GUDBJARNASON, S., MATHES, P., RAVENS, K. G. : Functional compartimentation of ATP and CP in heart muscle. J. Mol. Cell. Cardiology, 1 : 325, 1970.

93. GUDBJARNASON, S. : Acute alterations in energetic of ischemic heart muscle. In : Metabolism of the hypoxic and ischemic heart, p. 232. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

94. GUNNING, J. F., HARRISON, C. E., COLEMAN, H. N. : Myocardial contractility and energetics following treatment with d-thyroxine. Amer. J. Physiol., 226 : 1166, 1974.

95. HACKENBROCK, Ch. R. : Ultrastructural basis for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with changes in metabolic steady states in isolated liver mitochondria. J. Cell Biol., 30 : 269, 1966.

96. HACKENBROCK, Ch. R. : Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. Proc. Natl. Acad. Sci., 61 : 598, 1968.

97. HACKENBROCK, Ch. R., REHN, T. G., WEINBACH, E. C., LEMASTERS, J. J. : Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformations in mitochondria in the intact ascites tumor cells. J. Biol. Chem., 51 : 123, 1971.

98. HARRIS, E. J. : Mitochondrial anion uptake. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 31. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1969.

99. HARRIS, R. A., PENNISTON, J. T., ASAI, J., GREEN, D. E. : The conformational basis of energy transformations in membrane systems. II. Two forms of energized swelling. Proc. Natl. Acad. Sci., 59 : 830, 1968.

100. HASLEM, J. M., KREBS, H. A. : The permeability of mitochondria to oxaloacetate and malate. Bioch. J., 107 : 659, 1968.

101. HATT, P. Y., MORAVEC, J., SEROUSSI, S., SWYNGHEDAUW, B. : La consommation d'oxygène par le myocarde. I. La Presse Médicale, 77 : 1557, 1969.

102. HATT, P. Y., MORAVEC, J., SEROUSSI, S., SWYNGHEDAUW, B. : La consommation d'oxygène par le myocarde. II. La Presse Médicale, 77 : 1865, 1969.

103. HATT, P. Y., SWYNGHEDAUW, B., HAYAT, J. C. : Myocardial effects of Niridazole? Ann. N. Y. Acad. Sci., 160 : 799, 1969.

104. HATT, P. Y., BERJAL, G., MORAVEC, J., SWYNGHEDAUW, B. : Le myocarde ventriculaire dans l'insuffisance cardiaque expérimentale par insuffisance aortique chez le lapin. Etude au microscope électronique. Arch. Mal. Coeur, 63 : 383, 1970.

105. HATT, P. Y., BERJAL, G., MORAVEC, J., SWYNGHEDAUW, B. : Heart failure and electron microscopic study. J. Mol. Cell. Cardiol., 1 : 235, 1970.

106. HATT, P. Y., GROSGOGEAT, Y. : Ultrastructure myocardique. I. Le myocarde ventriculaire commun. La Presse Médicale, 78 : 687, 1970.

107. HATT, P. Y., MORAVEC, J. : Acute hypoxia of the myocardium ultrastructural changes. In : Metabolism of the hypoxic and ischaemic heart, p. 73. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

108. HAUGAARD, N., HAUGAARD, E. S., LEE, N. H., HORN, R. S. : Possible role of mitochondria in regulation of cardiac contractility. Feder. Proc., 28 : 1657, 1969.

109. HAUSAMEN, J. U., POCHE, R. : Die Ultrastruktur des Herzmuskels der Ratte nach einmaligen und wiederholten Unterdruckversuchen. Virchows Arch. Pathol. Anat., 339 : 212, 1965.

110. HEGGTVEIT, H. A., HERMAN, L., MISHARA, R. K. : Cardiac necrosis and calcification in experimental magnesium deficiency. Amer. J. Pathol., 45 : 757, 1964.

111. HEGGTVEIT, H. A. : Morphological alterations in the ischaemic heart. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 284. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

112. HERDSON, P. B., KALTENBACH, J. P., JENNINGS, R. B. : Fine structural and biochemical changes in dog myocardium during autolysis. Amer. J. Pathol., 57 : 539, 1968.

113. HILL, A. V. : Trails and trials in physiology. Edward Arnold Publ. Ltd., London, 1965.

114. HOLZER, H., DUNTZE, W. : Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. Ann. Rev. Biochem., 40 : 345, 1971.

115. HUNTER, G. R., KAMISHIMA, Y., BRIERLEY, G. P. : Morphological changes related to the permeability of isolated heart mitochondria. J. Cell Biol., 39 : 64 (Abs.), 1968.

116. HUNTER, G. R., KAMISHIMA, Y., BRIERLEY, G. P. : Ion transport by heart mitochondria. XV. Morphological changes associated with the penetration of solutes into isolated heart mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 180 : 81, 1969.

117. ILLINGWORTH, J. A. : Energetics of cardiac contraction. In : Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, Vol. 8. Roy, P. E., Harris, P. (Eds), University Park Press, Baltimore (in press).

118. INGRAHAM, L. L., PARDEE, A. B. : Free energy and entropy in metabolism. In : Metabolic Pathways, Vol. 1, p. 1. Greenberg, D. M. (Ed), Academic Press, London, 1967.

119. JACOBS, H., HELDT, H. W., KLINGENBERG, M. : High activity of creatine phosphokinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme. Bioch. Biophys. Res. Comm., 16 : 516, 1964.

120. JAGENDORF, A. T., URIBE, E. : ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci., 55 : 170, 1966.

121. JENNINGS, R. B., GANOTE, C. E., KLONER, R. A., WHALEN, D. A., HAMILTON, D. G. : Explosive swelling of myocardial cells irreversibly injured by transient ischemia. Symposium on Myocardial Cell Damage, Freiburg, 25-28 Sept., 1973.

122. JÖBSIS, F. F. : Spectrophotometric studies of intact muscle. I. Components of respiratory chain. J. Gen. Physiol., 46 : 905, 1963.

123. JÖBSIS, F. F. : Spectrophotometric studies of intact muscle. II. Recovery from contractile activity. J. Gen. Physiol., 46 : 929, 1963.

124. JÖBSIS, F. F., LEGALLAIS, V., O'CONNOR, M. : A regulated differential fluorimeter for assay of oxidative metabolism in intact tissues. I. E. E. E. Trans. Bio-Med. Eng., 13 : 93, 1966.

125. JÖBSIS, F. F., STAINSBY, W. N. : Oxidation of NADH during contractions of circulated mammaliam muscle. Resp. Physiol., 4 : 292, 1968.

126. JÖBSIS, F. F. : Use of pyrenbutyric acid to study the oxygenation of the heart muscle. Communication personnelle.

127. KALCKAR, M. M. : Biological Phosphorylations. Prentice Hall, N. J., 1969.

128. KATCHALSKY, A., CURBAN, P. F. : Non-equilibrium thermodynamics in Biophysics. Harvard University Press, Cambridge, 1965.

129. KAUFMANN, R. L., HOMBURGER, H., WIRTH, H. : Disorder in excitation-contraction coupling of cardiac muscle from cats with experimentally produced right ventricular hypertrophy. Circul. Res., 28 : 346, 1971.

130. KEILIN, D. : The history of cell respiration and cytochromes. Cambridge University Press, New York, 1966.

131. KLINGENBERG, M., SCHOLLMEYER, P. : Zür Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung. Biochem. Z., 333 : 335, 1960 and 335 : 231, 1961.

132. KLINGENBERG, M., PFAFF, E., TAGER, J., PAPA, S., QUAGLIARIELLO, E., SLATER, E. : Regulation of metabolic process in mitochondria. Biochim. Biophys. Acta Library, 7 : 180, 1966.

133. KLINGENBERG, M., PFAFF, E. : Metabolic control in mitochondria by adenine nucleotide translocation. Biochemical Society Symposium, n° 27, p. 105, Godwin, T. W. (Ed), Academic Press, London, 1968.

134. KLINGENBERG, M., HELDT, H. W., PFAFF, E. : The role of adenine nucleotide translocation in the generation of phosphorylation energy. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 237. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1969.

135. KLINGENBERG, M. : Respiratory control as function of the phosphorylation potential. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 189. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1969.

136. KLINGENBERG, M. : Mitochondrial metabolite transport. FEBS Letters, 6 : 146, 1970.

137. KLINGENBERG, M., FALKNER, G., ERDELT, H., GREBE, K. : On the relation between adenine nucleotide carrier sites and atractyloside binding in mitochondria. FEBS Letters, 16 : 296, 1971.

138. KLOCKE, F., BRAUNWALD, E., ROSS, J. Jr. : Oxygen cost of electrical activation of the heart. Circul. Res., 18 : 357, 1966.

139. KLOTZ, I. : Energy Changes in Biochemical Reactions. Academic Press, London, 1967.

140. KOHEN, E., MICHAELIS, M., KOHEN, C., THORELL, B. : A study of metabolic control and intracellular transport by multifunctional photon counting and two channel microfluorimetry. Exp. Cell Res., 77 : 195, 1973.

141. KOLTOVER, V. K., REICHMAN, L. M., YASAITIS, A. A., BLUMENFELD, L. A. : A study of spin-probe solubility in mitochondrial membranes correlated with ATP-dependent conformational changes. Biochim. Biophys. Acta, 234 : 306, 1971.

142. KORB, G. : Elektronmikroskopische untersuchungen zür Aludrin-Schädigung des Herzmuskels. Virchows Arch. Pathol. Anat., 339 : 136, 1965.

143. van KORFF, R. W. : Citric acid cycle dynamics and substrate compartimentation in mitochondria from rabbit heart. In : Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, p. 93. Mehlman, M. A., Hanson, R. W. (Eds), Academic Press, London, 1972.

144. van KORFF, R. W. : Metabolic characteristics of isolated rabbit heart mitochondria. J. Biol. Chem., 240 : 1351, 1965.

145. KRAAIJENHOF, R., TSOU, C. S., van DAM, K. : The determination of the rate of uptake of substrates by rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 172 : 580, 1969.

146. KRASNOW, N., MOLLET, E. L., YURCHAK, P. M., MOOD, W. B., GORLIN, R. : Isoproterenol and cardiovascular performance. Amer. J. Med., 37 : 514, 1964.

147. KRAUPP, O., ADLER-KASTNER, L., NIESSNER, H., PLANK, B. : The effect of starvation and acute and chronic alloxan diabetes on myocardial substrate levels and on liver glycogen in the rat in vivo. Europ. J. Biochem., 2 : 197, 1967.

148. KREBS, H., HENSELEIT, K. : Untersuchungen über die Harustoffbildung im Tierkörpen. Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, 210 : 33, 1932.

149. KREBS, H. A. : Mitochondrial generation of reducing power. In : Biochemistry of Mitochondria, p. 105. Slater, E. C., Kanigua, Z., Wojtczak, L. (Eds), Academic Press, London, 1967.

150. KREBS, H. A. : ATP/ADP ratios and free energy of ATP hydrolysis in cell regulation. Proc. Roy. Soc. B., 150 : 545, 1964.

151. KREBS, H. A. : The role of equilibria in the regulation of metabolism. In : Cellular Regulation, p. 45, Horecker, B. L., Stadtman, E. R. (Eds), Academic Press, London, 1969.

152. KREBS, H. A., JOHNSON, W. A. : The role of citric acid in intermediate metabolism of animal tissues. Enzymologia, 4 : 148, 1937.

153. KREBS, H. A., VEECH, R. L. : Pyridine nucleotide interrelations. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 329. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1969.

154. KREISBERG, R. A. : Effect of epinephrine on myocardial tryglycerides and free fatty acid utilization. Amer. J. Physiol., 210 : 385, 1966.

155. KRÜGER, F. A., LEIGHTY, E. L., WEISSLER, A. M. : Catecholamine stimulation of myocardial lipolysis and fatty acid reesterification. J. Clin. Invest., 46 : 1080, 1967.

156. KUBIŠTÁ, V., KUBIŠTOVÁ, J., PETTE, D. : Effect of thyroxine administration on α-glycerophosphate shuttle activity. Eur. J. Bioch., 18 : 553, 1971.

157. LANGENDORFF, O. : Untersuchungen am überlebender Saügethierherzen. Pflüg. Arch. Gesamte Physiol., 61 : 292, 1895.

158. LANGER, G. A. : The role of Sodium ion in the regulation of myocardial contractility. J. Cell Mol. Cardiol., 1 : 203, 1970.

159. La NOUE, K. F., NICKLAS, W. J., WILLIAMSON, J. R. : Control of citric acid cycle activity in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., 245 : 102, 1970.

160. La NOUE, K., WILLIAMSON, J. F. : Interrelationships between malate-aspartate shuttle and citric acid cycle in rat heart mitochondria. Metabolism, 20 : 119, 1971.

161. La NOUE, K., BRYLA, J., WILLIAMSON, J. R. : Feedback interactions in the control of citric acid cycle activity in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem., 247 : 667, 1972.

162. LARDY, H. A., WELLMAN, H. : Oxidative phosphorylation : the role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. J. Biol. Chem., 195 : 215, 1952.

163. LARDY, H. A., FERGUSON, S. M. : Oxidative phosphorylation in mitochondria. Ann. Rev. Biochem., 38 : 991, 1969.

164. LEE, C. P., ERNSTER, L. : Energy transfer systems of submitochondrial particles. II. Effects of oligomycin and aurovertin. Europ. J. Biochem., 3 : 391, 1967.

165. LEHNINGER, A. L. : Oxidative phosphorylation. Harvey Lectures Ser. 49 : 176, 1955.

166. LEHNINGER, A. L. : The mitochondrion. Benjamin W. A. Press, New York, 1965.

167. LEHNINGER, A. L. : Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation. Physiol. Rev., 46 : 67, 1966.

168. LEHNINGER, A. L. : Biochemistry. Worth Publishers Inc., New York, 1970.

169. LEHNINGER, A. L. : Ca transport by mitochondria and its possible role in the cardiac relaxation cycle. Circul. Res., 34, Suppl. III : 83, 1974.

170. LENIGER-FOLLERT, E., LÜBBERS, D. W. : Determination of local myoglobin concentration in the guinea pig heart. Pflüg. Arch., 341 : 271, 1973.

171. LEVINE, H. L., WAGMAN, R. J. : Energetics of the human heart. Amer. J. Cardiol., 9 : 372, 1962.

172. LEVY, M., TOURY, R., ANDRE, J. : Séparation des membranes mitochondriales. Purification et caractérisation enzymatique de la membrane externe. Biochim. Biophys. Acta, 135 : 599, 1967.

173. LINDENMAYER, G. E., SORDAHL, L. A., SCHWARTZ, A. : Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals with heart failure. Circul. Res., 23 : 439, 1968.

174. LIPMAN, F. : Metabolic generation and utilization of phosphate-boud energy. Advan. Enzymol., 1 : 99, 1941.

175. LOMBARDO, T. A., ROSE, L., TAESCHLER, M., TULLY, S., BING, R. J. : The effect of exercise on coronary blood flow, myocardial oxygen consumption and cardiac efficiency in man. Circulation, 7 : 71, 1953.

176. LOUD, A. V., BARANY, W. C., PACK, B. A. : Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in Electron micrographs. Labor. Invest., 14 : 258, 1965.

177. LOWENSTEIN, J. M. : Ammonia production in muscle and other tissues : the purine nucleotide cycle. Physiol. Rev., 52 : 382, 1972.

178. LOWENSTEIN, J. M. : Replenishment and depletion of citric acid cycle intermediates in muscle. In : Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in mitochondria p. 53. Mehlman, M. A., Manson, R. W. (Eds), Academic Press, London, 1972.

179. LÜBBERS, D. W., NIESSEL, W. : Rapid spectrophotometer for rabbit heart perfused with hemoglobin-free solution. Pflüg. Arch. Physiol., 268 : 286, 1959.

180. LÜBBERS, D. W. : Die bedentung des Sauerstoffdruckes für die O_2-Versergung des normalen und insuffizierten Herzens. In : Herzinsuffizienz, p. 287. Reindell, W., Keul, J., Doll, E. (Eds), Springer Verlag, Stuttgart, 1968.

181. LÜBBERS, D. W., WODICK, R. : Advances in spectrofotometric methods as applied to living tissue. XXV Internatl. Symp. Physiol. Sci., Munich, July 1971.

182. LÜBBERS, D. W. : Local pO_2 : its measurement and meaning. In : Oxygen Supply, p. 151. Kessler, H., Bruley, D. F., Clark, L. C., Lübbers, D. W., Silver, I. A., Strauss, J. (Eds), Urban & Schwarzenberg, München, 1973.

183. LUFT, J. H. : Improvements in epoxy resin embedding method. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 : 409, 1961.

184. MARECHAL, G. : Données récentes sur l'énergétique musculaire. In : Les Surcharges cardiaques, p. 85. Hatt, P. Y. (Ed), INSERM, Paris, 1972.

185. MAURAT, J. P., MERCIER, J. N., LEDOUX, C., HATT, P. Y. : Le myocarde dans les déplétions expérimentales en potassium chez le rat. Etude au microscope électronique. Arch. Mal. Coeur, 58 : 1004, 1965.

186. MEIJER, A. J., TAGER, J. M ., van DAM, K. : The movement of tricarboxylic acid across the mitochondrial membrane. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 147. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1969.

187. MEIJER, A. J. : Anion Translocation in Mitochondria. Ph. D Thesis, Univ. of Amsterdam, Amsterdam 1971.

188. MEIJER, A., van DAM, K. : The metabolic significance of anion transport in mitochondria.Biochim. Biophys. Acta, 346 : 213, 1974.

189. MILLS, E., JÖBSIS, F. F. : Effect of ouabain on papillary muscle developed force and redox conditions detected by surface fluorimetry. Communication personnelle.

190. MICHEL, R., LEBLANC, A. : Synthèses et activités biologiques des dérivés thyroxiniens et adrénergiques. IX. Influence des hormones thyroïdiennes et de leurs métabolites acétiques sur la respiration mitochondriale. Bull. Soc. Chim. Biol., 51 : 355, 1969.

191. MITCHELL, P. : Conduction of protons through the membranes of mitochondria and bacteria by uncouplers of oxidative phosphorylation. Biochem. J., 81 : 24P, 1961.

192. MITCHELL, P. : Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev., 41 : 445, 1965.

193. MITCHELL, P., MOYLE, J. : Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. Nature, 208 : 1025, 1965.

194. MITCHELL, P., MOYLE, J. : Estimation of membrane potential and pH difference accross the cristae membrane of rat liver mitochondria. Europ. J. Biochem., 7 : 471, 1969.

195. MÖLBERT, E. : Die Herzmuskelzelle nach akuter Oxydations Hemmung im elektronenmikroskopischen Bild. Beitr. Pathol. Anat. Pathol., 118 : 421, 1958.

196. MOMMAERTS, F. H. M. : Current problems in myocardial metabolism. Circul. Res., 35, Suppl. III : 2, 1974.

197. MONOD, J., CHANGEUX, J. P., JACOB, F. : Allosteric proteins and cellular control systems. J. Mol. Biol., 6 : 306, 1963.

198. MOORE, C. L. : Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. Bioch. Biophys. Res. Comm., 42 : 298, 1971.

199. MOORE, D. H., RUSKA, H. : Electron microscopic study of mammalian cardiac muscle cells. J. Biophys. Biochem. Cytol., 3 : 261, 1957.

200. MORAVEC, J., HATT, P. Y. : Effects of isuprel on the myocardium ; an electron microscopic analysis. In : Drugs and Metabolism of the Myocardium and Striatted Muscle, p. 85. Lamarche, M., Royer, R. (Eds), University Press, Nancy, 1969.

201. MORAVEC, J., HATT, P. Y. : Nécrose myocardique expérimentale provoquée par l'isopropylnoradrénaline. Pathol. Biol., 17 : 585, 1969.

202. MORAVEC, J. : L'effet inotrope positif des catécholamines. La Presse Médicale, 78 : 1009, 1970.

203. MORAVEC, J. : Les catécholamines et le coeur. Ann. Med. Int., 121 : 797, 1970.

204. MORAVEC, J., CORSIN, A., GUILLEMOT, H., HATT, P. Y. : Absence of the relationship between ultrastructure and metabolic state of heart mitochondria in situ. J. Mol. Cell. Cardiol., 2 : 161, 1971.

205. MORAVEC, J., HATT, P. Y. : Mechanochemical activity of mitochondria. An assessment. Editorial. J. Mol. Cell. Cardiol., 4 : 91, 1972.

206. MORAVEC, J., HATT, P. Y., OPIE, L. H., ROST, F. : The application of the cytophotometer to the study of metabolic transitions of isolated rat heart. Cardiology, 57 : 61, 1972.

207. MORAVEC, J., OPIE, L. H. : Effect of alterations of perfusion pressure on the redox state of isolated rat heart. In : Les Surcharges cardiaques, p. 135, Hatt, P. Y. (Ed), INSERM, Paris 1972.

208. MORAVEC, J., CORSIN, A., OWEN, P., OPIE, L. H. : Effect of increased aortic perfusion pressure on fluorescence emission of the isolated rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol., 6 : 187, 1974.

209. MORAVEC, J., CORSIN, A., HATT, P. Y. : Etude des spectres d'absorption des cytochromes cardiaques in situ. Arch. Internatl. Physiol. Bioch., 82 : 28, 1974.

210. MORAVEC, J., CORSIN, A., HATT, P. Y. : Dependence of myocardial redox systems on the concentration of exogenous substrate. In : Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, Vol. 8, Roy, P. E., Harris, P. (Eds), University Park Press, Baltimore (in press).

211. MOREL, F., LAUQUIN, G., LUNARDI, J., DUSZYNSKI, J., VIGNAIS, P. V. : An appraisal of the functional significance of the inhibitory effect of long chain CoAs on mitochondrial transport. FEBS Letters, 39 : 133, 1974.

212. MORET, P. R. : Myocardial metabolic changes in chronic hypoxia. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 161. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

213. MOSBACH, K., MATTIASSON, B. : Matrix-bound enzymes. II. The citric acid cycle. Acta Chem. Scand., 24 : 2093, 1970.

214. MUNN, E. A. : The Structure of Mitochondria. Academic Press, London, 1974.

215. NAYLER, W. G. : Some factors involved in the maintenance and regulation of cardiac contractility. Circul. Res., 21, Suppl. III : 213, 1967.

216. NEELY, J. R. : Metabolic effects of heart work. Ph. D. Thesis, Vanderbilt University, 1966.

217. NEELY, J. R., LIBERMEISTER, H., BATTERSBY, E. J., MORGAN, H. E. : Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. Amer. J. Physiol., 212 : 804, 1967.

218. NEELY, J. R., LIEBERMEISTER, H., MORGAN, H. E. : Effect of pressure development on membrane transport of glucose in isolated rat heart. Amer. J. Physiol., 212 : 815, 1967.

219. NEELY, J. R., DENTON, R. M., ENGLAND, P. J., RANDLE, P. J. : The effects of increased heart work on the triboxylate cycle and its interactions with glycolis in the perfused rat heart. Biochem. J., 128 : 147, 1972.

220. NEWSHOLME, E. A., RANDLE, P. J. : Regulation of glucose uptake by muscle. V. Effects of anoxia, insulin, adrenalin and prolonged starving. Biochem. J., 80 : 655, 1961.

221. NEWSHOLME, E. A. : The regulation of phosphofructokinase in muscle. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 2. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

222. NEWSHOLME, E. A. : Theoretical and experimental considerations on the control of glycolysis in the muscle. In : Essays in Cell Metabolism. Bartley, W., Kornberg, H. L., Quayle, S. E. (Eds), Wiley Interscience Publishers, N. Y., 1970.

223. NICOLAS, G., GOUHOUR, J. B. : L'ultrastructure du myocarde de rats au cours de l'autolyse. Pathol. Biol., 18 : 1065, 1970.

224. NIEDERGERKE, R. : Movements of calcium in frog ventricles at rest and during contracture. J. Physiol., 167 : 515, 1963.

225. OLSON, M. S., van KORFF, R. W. : Changes in endogenous substrate of isolated mitochondria from rabbit heart during storage. J. Biol. Chem., 242 : 325, 1967.

226. OLSON, R. E. : Utilisation of exogenous and endogenous lipids by the isolated perfused rat heart. In : Coronary Circulation and Energetics of the Myocardium, p. 162. Marchetti, G., Taccardi, B. (Eds), S. Karger, Basel, 1967.

227. ONISHI, S. : Ultrastructure of the hypoxic myocardium. Naturwissenschafte, 54 : 568, 1967.

228. OPIE, L. H., EVANS, J. R., SHIPP, J. C. : Effect of fasting on glucose and palmitate metabolism by perfused rat heart. Amer. J. Physiol., 205 : 1203, 1963.

229. OPIE, L. H. : Coronary flow rate and perfusion pressure as determinants of mechanical function and oxidative metabolism of isolated perfused rat heart. J. Physiol., 180 : 529, 1965.

230. OPIE, L. H. : Metabolism of the heart in health and disease. Part I. Amer. Heart J., 76 : 685, 1968.

230 bis. OPIE, L. H. : Metabolism of the heart in health and disease. Part II. Amer. Heart J., 77 : 100, 1969.

230 ter. OPIE, L. H. : Metabolism of the heart in health and disease. Part III. Amer. Heart J., 77 : 383, 1969.

231. OPIE, L. H., NEWSHOLME, E. A. : The activities of fructose 1-6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxylase in white and red muscle. Biochem. J., 103 : 391, 1967.

232. OPIE, L. H., MANSFORD, K. R. L., OWEN, P. : Effects of increased heart work on glycolysis and adenine nucleotides in the perfused heart of normal and diabetic rats. Biochem. J., 134 : 475, 1971.

233. OSTADAL, B., RYCHTEROVA, V., POUPA, O. : Isoproterenol-induced acute experimental cardiac necrosis in the turtle. Amer. Heart J., 76 : 645, 1968.

234. OU, L., TENNEY, S. : Properties of mitochondria from cattle aclimatized to high altitude. Resp. Physiol., 8 : 151, 1970.

235. PACKER, L., MARCHANT, R. H., MUKOHATA, Y. : Coupling of energy linked functions in mitochondria and chloroplasts to the control of membrane structure. In : Energy-linked Functions of Mitochondria, p. 51. Chance, B. (Ed), Academic Press, London, 1963.

236. PACKER, L. : Size and Shape Transformations correlated with oxidative phosphorylation in mitochondria. Swelling-shrinkage mechanisms in intact mitochondria. J. Cell Biol., 18 : 487, 1963.

237. PACKER, L., USTUMI, K. : The relation of respiration-dependent proton transfer to mitochondrial structure. Arch. Bioch. Biophys., 131 : 386, 1969.

238. PACKER, L. : Relation of structure to energy coupling in rat liver mitochondria. Feder. Proc., 29 : 1533, 1970.

239. PAGE, E., Mc CALLISTER, L. P. : Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Amer. J. Cardiol., 31 : 172, 1973.

240. PALADE, G. E. : The fine structure of mitochondria. Anat. Record, 114 : 427, 1952.

241. PALADE, G. E. : Electron microscopy of cytoplasmic structures. In : Enzymes : Units of Biological Structure and Function, p. 185. Gaebler, O. H. (Ed), Academic Press, London, 1956.

242. PARR, D. R., WIMHURST, J. M., HARRIS, E. J. : Calcium induced damage of rat heart mitochondria. Cardiovasc. Res., 9 : 366, 1975.

243. PARSONS, D. F. : Mitochondrial structure : Two types of subunits on negatively stained mitochondrial membranes. Science, 140 : 685, 1963.

244. PARSONS, D. F. : Recent advances correlating structure and function of mitochondria. Int. Rev. Exp. Pathol., 4 : 1, 1965.

245. PATRIARCA, P., CARAFOLI, E. : Study of the intracellular transport of Ca^{++} in rat heart. J. Cell Physiol., 72 : 29, 1968.

246. PATRIARCA, P., CARAFOLI, E. : A comparative study of the intracellular Ca^{++} movements in white and red muscle. Experientia, 25 : 598, 1969.

247. PEACHEY, L. D. : Electron microscopic observation on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules. J. Cell Biol., 20 : 95, 1964.

248. PEARSE, A. G. E. : The histochemistry and electron microscopy of obstructive cardiomyopathy. Ciba Foundation Symposium on Cardiomyopathies, p. 132. Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M. (Eds), Little Brown and Co, Boston, 1964.

249. PELOSI, G., AGLIATI, G. : The heart muscle in functional overload and hypoxia. A biochemical and ultrastructural study. Labor. Invest., 18 : 86, 1968.

250. PFAFF, E., KLINGENBERG, M. : Adenin nucleotide translocation of mitochondria. I. Specificity and control. Europ. J. Biochem., 6 : 66, 1968.

251. PFAFF, E. : The specificity of the nucleotide translocase. In : Mitochondrial Structure and Compartimentation, p. 305. Quagliariello, E., Papa, S., Slater, E. C., Tager, J. M. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1967.

252. PINNA, L. A., LORINI, M., MORET, V., SILIPRANDI, N. : Effect of oligomycin and succinate on mitochondrial metabolism of adenine nucleotides. Biochim. Biophys. Acta, 143 : 18, 1967.

253. POCHE, R. : Elektronenmikroskopische Untersuchungen zür Morphologie des Herzmuskels von Siebenschlafer wahrend des aktiven und des lethargischen Zustandes. Zeitsch. Zellforsch., 50 : 332, 1959.

254. POCHE, R., LOCHNER, W. : Ultrastruktur und Stoffwechsel der Herzmuskels vom Hund bei akuter Dinitrophenol-vergiftung. Frankfurter Zeitsch. Pathol., 72 : 34, 1962.

255. POCHE, R. : The effect of oxygen deficiency on the fine structure of the myocardium in the arrested and isolated beating rat hearts. Beitr. Pathol. Anat., 136 : 58, 1967.

256. POCHE, R., ARNOLD, D. G., NIER, H. : Die Ultrastruktur der Muskelzellen und der Blutcapillaren des isolierten Rattenherzens nach diffuser Ischämie und Hyperkapnie. Virchows Arch. Pathol. Anat., 346 : 239, 1969.

257. POUPA, O., KORECKÝ, B., KROFTA, K., RAKUŠAN, K., PROCHÁZKA, J. : The effect of anemia during the early postnatal development on vascularization of the myocardium and its resistence to anoxia. Physiol. Bohemoslov., 13 : 281, 1964.

258. POUPA, O., TUREK, Z., KALUŠ, M., KROFTA, K. : Acute cardiac infarct-like necrosis in high altitute adapted rats. Physiol. Bohemoslov., 14 : 542, 1965.

259. POUPA, O., OŠŤÁDAL, B. : Experimental cardiomegalies and "cardiomegalies" in free living animals. Ann. N. Y. Acad. Sci., 156 : 445, 1969.

260. PULLMAN, M. E., SCHATZ, G. : Mitochondrial oxidations and energy coupling. Ann. Rev. Biochem., 36 : 539, 1967.

261. RAAB, W. : The adrenergic-cholinergic control of myocardial metabolism and function. Advan. Cardiol., 1 : 65, 1956.

262. RACKER, E. : Studies of factors involved in oxidative phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci., 48 : 1659, 1962.

263. RACKER, E. : Topography of coupling factors in oxidative phosphorylation. In : Energy-linked Function of Mitochondria, p. 75. Britton Chance (Ed), Academic Press, London, 1963.

264. RACKER, E. : Mechanisms in Bioenergetics. Academic Press Inc., London, 1965.

265. RAKUŠAN, K., TIETZOVÁ, H., TUREK, Z., POUPA, O. : Cardiomegaly after repeated application of isoprenaline in the rat. Physiol. Bohemoslov., 14 : 456, 1965.

266. RAKUŠAN, K., BRAASCH, W., de ROCHEMONT, W. M. : The terminal capacity of the vascular bed and the capacity of the terminal vascular bed in normal heart muscle of a dog. Physiol. Bohemoslov., 18 : 7, 1969.

267. RAKUŠAN, K., OŠTADAL, B., WACHTLOVÁ, M. : Influence of muscular work on the capillary density in the heart and skeletal muscle of pigeon. Canad. J. Physiol. Pharmacol., 49 : 167, 1971.

268. RAKUŠAN, K. : Quantitative morphology of capillaries of the heart. In : Methods and Achievments in Experimental Pathology, p. 272. Bajusz, E., Jasmin, G. (Eds), S. Karger, Basel, 1971.

269. RAKUŠAN, K. : Myocardial oxygen tension and its dependence upon major oxygen determinants. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 124. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

270. RANDLE, P. J., NEWSHOLME, E. A., GARLAND, P. B. : Regulation of glucose uptake by muscle. VIII. Effects of fatty acids ketone bodies and pyruvate and alloxandiabetes and starvation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. Biochem. J., 93 : 652, 1964.

271. RANDLE, P. J., ENGLAND, P. J., DENTON, R. M. : Control of tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis during acetate utilization in rat heart. Biochem. J., 117 : 677, 1970.

272. REGAN, T. J., MOSCHOS, C. B., OLDEWURTEL, H. A., WEISSE, A. B., ASOKAN, S. K. : Dominance of lipid metabolism in the myocardium under the influence of l-norepinephrine. J. Lab. Clin. Med., 70 : 221, 1967.

273. REICHART, E. : Description d'une enceinte pour hypercapnie prolongée chez les petits animaux. Pathol. Biol., 14 : 719, 1966.

274. REID, R. A., MOYLE, J., MITCHELL, P. : Synthesis of adenosine triphosphate by a protron motive force in rat liver mitochondria. Nature, 212 : 257, 1966.

275. REIMER, K. A., JENNINGS, R. B. : Protection of ischemic myocardium by propranolol. Fed. Proc., 32 : 875 (abs), 1973.

276. REMEDIOS DOS, C. G., MILLIKAN, R. G. C., MORALES, M. F. : Polarization of tryptophan fluorescence from single striated muscle fibers. A molecular probe of contractile state. J. Gen. Physiol., 59 : 103, 1972.

277. REYNAFARJE, B. : Effect of chronic hypoxia on the kinetics of energy transformation in heart mitochondria. In : Metabolism of the hypoxia and ischaemic heart, p. 206. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

278. REYNOLDS, E. S. : The use of lead citrate at high pH as an electro-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17 : 208, 1963.

279. RONA, G., CHAPPEL, C. I., BALASZ, T., GAUDAY, R. : An infarct-like myocardial lesions and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. Arch. Pathol., 67 : 443, 1959.

280. RONA, G., BOUTET, I., HUNTER, I. : Membrane permeability alterations and manifestation of early muscle cell injury. Symposium on Myocardial Cell Damage, Freiburg, 25-28 Sept., 1973.

281. ROSENMANN, E., GAZENFIELD, E., LAUFER, A., DAVIES, A. M. : Isoproterenol-induced myocardial lesions in the immunized and nonimmunized rat. Path. Microbiol. (Bâle), 27 : 303, 1964.

282. ROSSI, C. S., CARAFOLI, E., DRAHOTA, Z., LEHNINGER, A. L. : The stochiometry and the dynamics of energy-linked accumulation of Ca^{++} by mitochondria. In : Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, p. 317. Tager, J. M., Papa, S., Quagliriello, E., Slater, E. (Eds), Elsevier 1966.

283. ROSSI, C. R., SILIPRANDI, N. : Some considerations on the GTP-dependent fatty-acid activation and on carnitine barrier. In : Mitochondrial Structure and Compartimentation, p. 411. Quagliariello, E., Papa, S., Slater, E. C., Tager, J. M . (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1967.

284. ROSSI, E., AZZONE, G. F. : Ion transport in liver mitochondria. IV. Relationship between ion translocation and electron transport. J. Biol. Chem., 243 : 1514, 1968.

285. ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUÏL, Y. M., CORABOEUF, E. : Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. Pflüg. Arch. Ges. Physiol., 308 : 91, 1969.

286. RUSHMER, A. : Cardiovascular Dynamics. Saunders, Philadelphia, 1961.

287. SAFER, B., SMITH, C. M., WILLIAMSON, J. R. : Control of the transport of reducing equivalent across the mitochondrial membrane in perfused rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol., 2 : 111, 1971.

288. SAFER, B., DAVIS, R. E. : Effects of hydrogen ions on physiological and biochemical function of heart. Feder. Proc., 32 : 449 (Abs), 1973.

289. SAFER, B., WILLIAMSON, J. R. : Mitochondrial cytosolic interactions in perfused rat heart. J. Biol. Chem., 248 : 2570, 1973.

290. SCHAFFER, S. W., SENNESH, J., WILLIAMSON, J. R. : Cardiac metabolism during H^+ induced heart failure. Feder. Proc., 32 : 450 (Abs), 1973.

291. SCHEUER, J. : Myocardial metabolism in cardiac hypoxia. Amer. J. Cardiol., 19 : 385, 1967.

292. SCHEUER, J., STEZOSKI, S. W. : Effects of high energy phosphate depletion and repletion on dynamics of electrocardiogram of isolated rat heart. Circul. Res., 23 : 519, 1968.

293. SCHNAITMAN, C., GRENAWALT, S. W. : Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. J. Cell. Biol., 38 : 158, 1968.

294. SCHUCHHARDT, S. : Distribution of O_2 pressure on the surface of the isolated perfused heart. Pflüg. Arch., 307 : R 24, 1969.

295. SCHUCHHARDT, S. : The intramyocardial oxygen pressure at normoxia and hypoxia. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 125. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

296. SCHWARTZ, A. : Electron transport and mitochondria. In : Metabolism of the Hypoxic and Ischaemic Heart, p. 35. Moret, P., Fejfar, Z. (Eds), S. Karger, Basel, 1972.

297. SCRIVEN, L. E. : Intracellular transport analysis. 11th Internatl. Congr. Cell Biol., Brown University, Providence, R. I., Sept. 1964. Cité par SRERE, P., cf. n° 316.

298. SELIGMAN, A. M., HAYDON, G. B., SMITH, S. O. : Observations on mitochondrial staining for Succinyl dehydrogenase. J. Histochem. Cytochem., 15 : 752, 1968.

299. SELYE, H., GABBIANI, G. : The role of electrolytes in the pathogenesis of experimental cardiopathy without vascular involvement. In : Electrolytes and Cardiovascular Diseases, p. 135. Bajusz, E. (Ed), S. Karger, 1965.

300. SHEPERD, J., GARLAND, P. B. : ATP-controlled acetoacetate and citrate synthesis by rat liver mitochondria oxidizing palmitoyl-carnitine and the inhibition of citrate synthase by ATP. Bioch. Biophys. Res. Comm., 22 : 89, 1966.

301. SHIPP, J. C., OPIE, L. H., CHALLONER, D. : Fatty acid and glucose metabolism in the perfused heart. Nature, 189 : 1018, 1961.

302. SJÖSTRAND, F. S. : Ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope. Intern. Rev. Cytol., 5 : 455, 1956.

303. SJÖSTRAND, F. S. : A new ultrastructural element of the membranes in mitochondria and some cytoplasmic membranes. J. Ultrastructure Res., 9 : 340, 1963.

304. SLATER, E. S. : Oxidative phosphorylation. Rev. Pure Appl. Chem., p. 221, 1958.

305. SLATER, E. C. : An evaluation of the Mitchell hypothesis. Europ. J. Biochem., 1 : 317, 1967.

306. SLATER, E. C. : The oxidative phosphorylation potential. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 255. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1969.

307. SLAUTTERBACK, D. B. : Mitochondria in cardiac muscle cells of the canary and some other birds. J. Cell Biol., 24 : 1, 1965.

308. SMITH, C. H., WILLIAMSON, J. R. : Inhibition of citrate synthase by succynyl-CoA and other metabolites. FEBS Letters, 18 : 35, 1971.

309. SMOLY, J. B., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, L. : Topological and functional organization of the mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci., 66 : 125, 1970.

310. SOBEL, B., JEQUIER, E., SJØERDSMA, A., LOVENBERG, W. : Effect of catecholamines and adrenergic blocking agents on oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria. Circul. Res., 19 : 1050, 1966.

311. SOBEL, B. E., SPANN, J. F., POOL, P. E., SONNENBLICK, E. H., BRAUNWALD, E. : Normal oxidative phosphorylation in mitochondria from failing heart. Circul. Res., 21 : 355, 1967.

312. SONNENBLICK, E. H., ROSS, J., COVELL, J. W., KAISER, G. A., BRAUNWALD, E. : Velocity of contraction as a determinant of myocardial oxygen consumption. Amer. J. Physiol., 209 : 919, 1965.

313. SONNENBLICK, E. H., ROSS, J., BRAUNWALD, E. : Oxygen consumption of the heart. Newer concepts of its multifactoral determination. Amer. J. Cardiol., 22 : 328, 1968.

314. SORDAHL, L. A., BLAILOCK, Z. R., KRAFT, G. H., SCHWARTZ, A. : The possible relationship between ultrastructure and biochemical state of heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 132 : 404, 1969.

315. SORDAHL, L. A., WOOD, W. G., SCHWARTZ, A. : Distribution of mitochondrial populations on sucrose gradients isolated under varying conditions. Feder. Proc., 29 : 449, 1970.

316. SRERE, P. : Is there an organisation of Krebs cycle enzymes in the mitochondrial matrix ? In : Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, p. 79. Mehlman, M. A., Hanson, R. W. (Eds), Academic Press, 1972.

317. STEIN, O., STEIN, Y. : Metabolism of fatty acids in the isolated perfused rat heart. Biochim. Biophys. Acta, 70 : 517, 1963.

318. STEIN, O., STEIN, Y. : Lipid synthesis intracellular transport and storage. III. Electron radioautographic study of rat heart perfused with tritiated oleic acid. J. Cell Biol., 36 : 62, 1968.

319. STONER, C., SIRAK, H. D. : Osmotically-induced alterations in volume and structure of mitochondria isolated from rat liver and bovine heart. J. Cell Biol., 43 : 521, 1969.

319 bis. STONER, C., SIRAK, H. D. : Passive induction of the "energy-twisted" conformational state in bovine heart mitochondria. Bioch. Bioph. Res. Comm., 35 : 59, 1969.

320. STROMER, M. H., HARTSHORNE, D. J., MUELLER, H., RICE, R. U. : The effect of various protein fractions on Z-line and M-bands reconstitution and removal. J. Cell Biol., 40 : 167, 1969.

321. SULKIN, N. M., SULKIN, D. F. : An electron microscopic study of the effects of chronic hypoxia on cardiac muscle, hepatic and autonomic ganglion cells. Labor. Invest., 14 : 1523, 1965.

322. SWYNGHEDAUW, B., CORSIN, A. : Les effets d'une perfusion hyper ou hypocalcique sur la glycolyse du coeur isolé de lapin. Arch. Internatl. Physiol. Bioch., 77 : 181, 1969.

323. VALDIVIA, E. : Total capillary bed of the myocardium in chronic hypoxia. Feder. Proc., 21 : 221, 1962.

324. van DAM, K., TSOU, C. S. : Accumulation of substrate anions by mitochondria. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 21. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, 1969.

325. van DAM, K., MEYER, A. J. : Oxidation and energy conservation by mitochondria. Ann. Rev. Biochem., 40 : 115, 1971.

326. VASINGTON, F. D., MURPHY, J. V. : Ca^{++} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem., 237 : 2670, 1962.

327. VASINGTON, F. D., GAZZOTI, P., TIOZZO, R., CARAFOLI, E. : The effect of ruthenium red on Ca^{++} transport and respiration in liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 256 : 43, 1972.

328. VASSORT, G., ROUGIER, G., GARNIER, D., SAUVIAT, M. P., CORABOEUF, E., GARGOUÏL, Y. M. : Effets de l'adrénaline sur les courants entrants transmembranaires au cours de l'activité cardiaque. C. R. Acad. Sci., 267 : 1762, 1968.

329. VIAL, C., GAUTHERON, D. : Creatine kinase in pig heart mitochondria. Properties and role in phosphate potential regulation. Biochimie, 54 : 843, 1972.

330. VIGNAIS, P. V., VIGNAIS, P. M. : Revised data on (^{35}S) Atractyloside binding to mitochondrial membrane. Biochem. Biophys. Res. Comm., 38 : 843, 1970.

331. VIGNAIS, P. V., VIGNAIS, P. M., LAUQUIN, G., MOREL, F. : Binding of adenosine diphosphate and of antagonist ligands to the mitochondrial ADP carrier. Biochimie, 55 : 763, 1973.

332. VIGNAIS, P. V., VIGNAIS, P. M., STANISLAS, E. : Action of potassium atractylate on oxidative phosphorylation in mitochondria and in submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta, 60 : 284, 1962.

333. van VLEET, J. F., HATT, B. V., SIMON, J. : Vitamin E deficiency. Electron microscopic study of muscle degeneration. Amer. J. Pathol., 52 : 1067, 1968.

334. WACHTLOVÁ, M., RAKUŠAN, K., POUPA, O. : The terminal vascular bed in the heart of the hare and the rabbit. Physiol. Bohemoslov., 14 : 328, 1965.

335. WACHTLOVÁ, M., RAKUŠAN, R., POUPA, O. : Kvantitativní rozdíly terminalniho krevního řečiště myokardu netopýra velkého a myši laboratorní. Čs. Fysiol., 17 : 16, 1968.

336. WEBER, N. E., BLAIR, P. V. : Ultrastructural studies of beef heart mitochondria. II. Adenine nucleotide induced modifications of mitochondrial morphology. Biochem. Biophys. Res. Comm., 41 : 821, 1970.

337. WEIBEL, E. R., KISTLER, G. S., SCHERLE, W. F. : Practical stereoligical methods in morphometric cytology. J. Cell Biol., 30 : 23, 1966.

338. WEINBACH, E. C., GARBUS, J., SHEFFIELD, H. G. : Morphology of mitochondria in the coupled, uncoupled and recoupled states. Exp. Cell. Res., 46 : 129, 1967.

339. WEISSLER, A. M., KRUGER, F. A., NOBUHISA, B., SCARPELLI, G. D., LEIGHTON, R. J., GALLIMORE, J. F. : Role of anaerobic metabolism in the preservation of functional capacity and structure of anoxic myocardium. J. Clin. Invest., 47 : 403, 1968.

340. WENKE, M. : Metabolické účinky katecholových aminů. Rozpravy Československ. Akademie Věd., 75 : S 12, Praha, 1965.

341. WHALEN, J. W. : Oxygen availibility in muscle. In : Factors Influencing Myocardial Contractility, p. 395. Tanz, R. D., Kavaler, D., Roberts, J. (Eds), Academic Press, London, 1968.

342. WHEREAT, A. F., ORISHIMO, M. W., NELSON, J. : The localisation of different synthetic systems for fatty acids in inner and outer mitochondrial membranes from rabbit heart. J. Biol. Chem., 244 : 6498, 1969.

343. WILLIAMS, G. R., ORR, J. L., WONG, G. S. : Anion transport and the regulation of the citric acid cycle. In : Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, p. 63. Mehlman, M. A., Hanson, R. W. (Eds), Academic Press, London, 1972.

344. WILLIAMSON, J. R., KREBS, H. A. : Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart. Biochem. J., 80 : 540, 1961.

345. WILLIAMSON, J. R., CORKEY, B. E. : Assay of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorimetric methods. In : Methods in Enzymology, Vol. 13 : 434. Lowenstein, J. M. (Ed), Academic Press, New York, 1963.

346. WILLIAMSON, J. R., JAMIENSON, D. : Metabolic effects of epinephrine in perfused rat heart. Mol. Pharmacol., 2 : 191, 1965.

347. WILLIAMSON, J. R., JAMIENSON, D. : Dissociation of the inotropic from glycolytic effect of epinephrine in isolated rat heart. Nature, 206 : 364, 1965.

348. WILLIAMSON, J. R. : Glycolytic control mechanisms. I. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in isolated perfused rat heart. J. Biol. Chem., 240 : 2308, 1965.

349. WILLIAMSON, J. R. : Glycolytic control mechanisms. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic anoxic transition in perfused rat heart. J. Biol. Chem., 241 : 5026, 1966.

350. WILLIAMSON, J. R., JAMIENSON, D. : Metabolic effects of epinephrine in perfused rat heart. I. Comparison of intracellular redox states, tissue pO_2 and contractility. Mol. Pharmacol., 2 : 191, 1966.

351. WILLIAMSON, J. R. : Metabolic effects of epinephrine in the perfused rat heart. II. Control steps of glucose and glycogen metabolism. Mol. Pharmacol., 2 : 205, 1966.

352. WILLIAMSON, D. H., LUND, P., KREBS, H. A. : The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem. J., 103 : 514, 1967.

353. WILLIAMSON, J. R. : Calculations of metabolic concentrations in the cytosol and mitochondria of rat liver. In : The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, p. 329. Papa, S., Tager, J. M., Quagliariello, E., Slater, E. C. (Eds), Adriatica Editrice, Bari, 1969.

354. WILLIAMSON, J. R., ANDERSON, J., BROWNING, E. T. : Inhibition of gluconeogenesis by butymalonate in perfused rat liver. J. Biol. Chem., 245 : 1717, 1970.

355. WILLIAMSON, J. R., SMITH, C. M., La NOUE, K. F., BRYLA, J. : Feedback control of the citric acid cycle. In : Energy Metabolism and Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, p. 185. Mehlman, M. A., Hanson, R. W. (Eds), Academic Press, London, 1972.

356. WILSON, D. F., DUTTON, P. L. : Oxidation reduction potentials of cytochrome a and a_3 in intact rat liver mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 136 : 583, 1970.

357. WILSON, D. F., DUTTON, P. L. : Energy dependent changes in oxydation reduction potentials of cytochrome b. Biochem. Biophys. Res. Comm., 39 : 59, 1970.

358. WINEGRAD, S. : Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. J. General Physiol., 48 : 455, 1965.

359. WOJTCZAK, L., WLODAWER, P., ZBOROWSKI, J. : ATP induced contraction of rat liver mitochondria and synthesis of mitochondrial phospholipids. Biochim. Biophys. Acta, 70 : 290, 1963.

360. WOJTCZAK, L., ZATUSKA, H. : Inhibition by oleate of the binding and exchange of ATP by mitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta, 189 : 455, 1969.

361. WOLLENBERGER, A., RISTAU, O., SCHOFFA, G. : Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühling grösserer Gewebsstücke. Pflüg. Arch. Ges. Physiol., 270 : 399, 1960.

362. WOLLENBERGER, A., KLETTKE, B., RAABE, G. : Some metabolic characteristics of mitochondria from chronically overloaded hypertrophied hearts. Exp. Mol. Pathol., 2 : 251, 1963.

363. WOLLENBERGER, A., KLEITKE, B., SCHULZE, W. : The conditioning of the mitochondria in the hypertrophied hearts of dogs with slowly developing stenosis of the aorta. Acta Biol. Med. Germ., 17 : 334, 1966.

364. YAGI, K., MASE, R. : Possible compartmentation of adenosine nucleotides in a coupled reaction system composed of F actomyosin-ATP and CP-kinase. In : Molecular Biology of Muscular Biology and Contraction, p. 109. Ebashi, S., Osawa, F., Sekine, T., Tonomura, Y. (Eds), Elsevier Publishing Co, Amsterdam, 1965.

365. YATES, J. C., DHALLA, N. S. : Structural and functional changes associated with failure and recovery of hearts after perfusion with Ca^{++}-free medium. J. Mol. Cell. Cardiol., 7 : 91, 1975.

366. YONETANI, T. : Difference spectra of the cytochrome a oxidase. J. Biol. Chem., 236 : 1680, 1961.

367. ZAK, R., DOWELL, T., MARTIN, A. F., RABINOWITZ, M. : Protein synthesis in work-overloaded myocardium. In : Heart Overloading, p. 283. Hatt, P. Y. (Ed), INSERM, Paris, 1972.

Université de Paris-Sud - "Centre d'Orsay"

Vu et permis d'imprimer, Orsay, le 30 Juillet 1975

Le Président de la thèse

E. CORABŒUF

Imp. Bosc Frères, Lyon - Dépôt légal n° 6151 - 4e trimestre 1975